

STUDIEN ZUM PROLINSTOFFWECHSEL DER NIERE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

Thomas Schorn

1982



Aus dem Instiut für Klinische Chemie des Städtischen
Krankenhauses München-Schwabing

Direktor: Prof. Dr. O. H. Wieland

STUDIEN ZUM PROLINSTOFFWECHSEL DER NIERE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Thomas Schorn
aus
Baden-Baden

1982

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Guder
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. M. Knedel
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 5. 1982



Herrn Prof. Dr. W. Guder danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Dr. G. Wirthensohn bin ich dankbar für die vielen guten Ratschläge und nützlichen Diskussionen.

Frau S. Pürschel und Frau M. Gerl waren mir bei der Ausführung des experimentellen Teils eine große Hilfe.

Frau C. Hargesheimer danke ich für das Schreiben des Manuskripts und Frau E. Rausch für die Anfertigung der Abbildungen.

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Die Stellung des Prolinstoffwechsels im tierischen Organismus	1
1.2. Enzymschritte des renalen Prolinstoffwechsels	1
2. <u>Eigene Fragestellung</u>	4
3. <u>Besprechung der eigenen Ergebnisse und Dis- kussion</u>	5
3.1. Prolinstoffwechsel in isolierten Nierentubuli	5
3.1.1. Abhängigkeit der Glukose-, Glutamat- und Am- moniakbildung aus Prolin von der Inkubations- zeit	5
3.1.2. Abhängigkeit der Glukose-, Ammoniak- und Glu- tamatbildung von der Prolinkonzentration	5
3.1.3. Bilanz des Kohlen- und Stickstoffwechsels von Prolin in isolierten Nierenrindentubuli	8
3.2. Wechselwirkungen zwischen Prolin und anderen Energiesubstraten des Nierenstoffwechsels	14
3.2.1. Oleat und Prolin	16
3.2.2. Glutamin und Prolin	19
3.2.3. 2-Ketoglutarat und Prolin	23
3.2.4. Succinat und Prolin	25
3.2.5. Laktat und Prolin	27
3.2.6. Einfluß einer Transaminasehemmung auf den Laktat- und Prolinstoffwechsel	32
3.2.7. Pyruvat und Prolin	37
3.2.8. Dihydroxyaceton und Prolin	39
3.3. Studien zur Prolinoxidase in der Niere	40
3.3.1. Meßverfahren für Prolinoxidase	40
3.3.2. Einfluß von Einfrieren auf die Prolinoxidase- aktivität in Zellfraktionen gepotterter Nie- renrinden	43

3.3.3.	Lokalisation des Prolinstoffwechsels in der Niere	45
3.3.4.	Einfluß von Azidose und Alkalose auf die Aktivität der renalen Prolinoxidase	49
4.	<u>Allgemeine Diskussion</u>	
4.1.	Welche Stellung nimmt Prolin in der Hierarchie der Energiesubstrate der Niere ein?	52
4.2.	Welche Beziehungen bestehen zwischen dem renalen Prolintransport und dem Prolinstoffwechsel?	56
4.3.	Physiologische Betrachtungen und Ausblick	57
5.	<u>Materialien</u>	59
5.1.	Geräte	59
5.1.1.	Zentrifugen	59
5.1.2.	Homogenisatoren	59
5.2.3.	Photometer	59
5.1.4.	Schüttelwasserbäder	59
5.2.	Chemikalien	59
5.3.	Versuchstiere	60
5.4.	Standarddiät	60
6.	<u>Methoden</u>	60
6.1.	Inkubationsmedium	60
6.2.	Herstellung isolierter Nierenrindentubuli	60
6.3.	Aminosäureanalyse eines Tubulusversuchs	61
6.4.	Herstellung einer Oleatlösung	62
6.5.	Albumin-Reinigung	62
6.6.	Herstellung von Nierenhomogenaten und Zellfraktionen	63
6.7.	Dissektion verschiedener Säugernieren in Rinde und Markanteile	65

6.8.	Herstellung einer azidotischen und alkalotischen Stoffwechsellaage bei Hungerratten	66
6.9.	Inkubationsbedingungen bei Stoffwechselversuchen	67
6.10.	Analytische Methoden	67
6.10.1.	Proteinbestimmung	67
6.10.2.	Substrat- und Metabolitbestimmungen	68
6.10.3.	Bestimmung der Prolinoxidase	68
6.10.3.1.	Messung der Prolinoxidase mit o-Aminobenzaldehyd	68
6.10.3.2.	Messung der Prolinoxidase mit einem Tetrazoliumsalz	70
6.11.	Bestimmung der Succinat-Dehydrogenase mit einem Tetrazoliumsalz	71
6.12.	Auswertung und statistische Analyse	72
7.	<u>Zusammenfassung</u>	73
8.	<u>Literaturverzeichnis</u>	75

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Stoffwechselwege von L-Prolin in der Säugerniere	2
Abb. 2:	Abhängigkeit der Glukose-, Ammoniak- und Glutamatbildung aus Prolin von der Inkubationszeit	6
Abb. 3:	Abhängigkeit der Glukose-, Ammoniak- und Glutamatbildung von der Prolinkonzentration	7
Abb. 4:	Kohlenstoff- und Stickstoffbilanz von Prolin in isolierten Tubuli	12
Abb. 5:	Wechselbeziehungen von Prolin mit anderen Energiesubstraten der Nierenrinde auf der Ebene des Wasserstoffs	15
Abb. 6:	Hypothetischer Mechanismus der Wechselbeziehungen zwischen 2-Ketoglutarat und Prolin	24
Abb. 7:	Hemmung der renalen Prolinoxidase durch Laktat	29
Abb. 8:	Enzymkinetik der Prolinoxidase-Hemmung durch Laktat	29
Abb. 9:	Hypothetischer Mechanismus der Wechselwirkungen zwischen Laktat und Prolin	31
Abb. 10:	Intrazelluläres Verteilungsmuster der renalen Prolinoxidase in Abhängigkeit von der Bestimmungsmethode	42
Abb. 11:	Verteilung der Prolinoxidase und Succinat-Dehydrogenase in verschiedenen Abschnitten von Säugernieren	47
Abb. 12:	Hypothetische Hierarchie der Energiesubstrate des Nierenrindenstoffwechsels	54

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Wirkung von 5 mM Prolin auf den Aminosäurestoffwechsel in isolierten Tubuli	9
Tab. 2:	Kohlenstoff- und Stickstoffbilanz von Prolin in isolierten Tubuli der Rattenniere	10
Tab. 3:	Wechselwirkungen zwischen Oleat und Prolin in isolierten Tubuli gehungerter Ratten	17
Tab. 4:	Energiebilanz der Glukoneogenese aus ausgesuchten Nierensubstraten	18
Tab. 5:	Wechselwirkungen zwischen Glutamin und Prolin in isolierten Nierentubuli von Hungerratten	20
Tab. 6:	Wechselwirkungen zwischen 2-Ketoglutarat und Prolin in isolierten Nierentubuli von Hungerratten	22
Tab. 7:	Wechselwirkungen zwischen Succinat und Prolin in isolierten Nierentubuli von Hungerratten	26
Tab. 8:	Wechselwirkungen zwischen Laktat und Prolin in isolierten Tubuli von Hungerratten	28
Tab. 9:	Wirkung einer Transaminasehemmung auf den Laktat- und Prolinstoffwechsel in isolierten Nierentubuli von Hungerratten	33
Tab. 10:	Wechselwirkungen zwischen Laktat und Prolin in Anwesenheit von Aminoxyacetat in isolierten Nierentubuli gehungerter Ratten	34
Tab. 11:	Wechselwirkungen zwischen Pyruvat und Prolin in isolierten Nierentubuli von Hungerratten	36

Tab. 12:	Wechselwirkungen zwischen Dihydroxyaceton und Prolin in isolierten Tubuli von Hunger- ratten	38
Tab. 13:	Vergleich zweier Meßmethoden für Prolinoxidase in Homogenaten der Rattennierenrinde	41
Tab. 14:	Einfluß mehrmaligen Einfrierens auf die Prolinoxidaseaktivität in Zellfraktionen von gepotterten Nierenrinden	44
Tab. 15:	Vergleich der Enzymaktivitäten von Prolinoxidase und Succinat-Dehydrogenase in Nierenrinden von mehreren Säugerspezies	46
Tab. 16:	Säure-Basenhaushalt von fünf Ratten nach NH_4 - oder NaHCO_3 -Fütterung	50
Tab. 17:	Einfluß von Azidose und Alkalose auf die Aktivität der renalen Prolinoxidase	50
Tab. 18:	Wechselwirkungen zwischen Energiesubstraten auf die Aufnahmeraten in Nierenrindenpräparationen	53
Tab. 19:	Einfluß von energieliefernden Substraten auf die Ammoniakbildung aus Prolin und Glutamin in Nierenrindenpräparationen	53

Abkürzungsverzeichnis

ABA	ortho-Aminobenzaldehyd
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ALA	Alanin
AOA	Aminooxyacetat
ASP	Aspartat
Cyt c	Cytochrom c
Co Q	Coenzym Q
DHA(P)	Dihydroxyaceton(phosphat)
FAD(H ₂)	Flavinadenindinukleotid oxidiert (reduziert)
FMN(H ₂)	Flavinmononukleotid oxidiert (reduziert)
FUM	Fumarat
GADP	Glycerinaldehydphosphat
GOT _M (Z)	Mitochondriale (zytosolische) Glu- tamat-Oxalacetat-Transaminase
GP	Glycerinphosphat
GSA	Glutamat-Semialdehyd
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
GLU	Glutamat
GLUC	Glukose
GLUNH ₂	Glutamin
HPO	4-Hydroxyprolin
INT	Iodonitrotetrazolium-Chlorid
KG	2-Ketoglutarat
LAC	Laktat
MAL _M (Z)	Mitochondriale (zytosolische) Malat- Dehydrogenase
NAD(H)	Nicotinadenindinukleotid oxidiert (reduziert)
NADP(H)	Nicotinadenindinukleotidphosphat oxidiert (reduziert)
OA	Oxalacetat
ORN	Ornithin

PEP	Phosphoenolpyruvat
PMS	Phenazinmethosulfat
PRO	L-Prolin
PRO	Prolinoxidase
P2C	Pyrrolin-2-Carboxylat
P5C	Pyrrolin-5-Carboxylat
PYR	Pyruvat
SER	Serin
SUC	Succinat
SUCCOA	Succinyl CoA

1. Einleitung

1.1. Die Stellung des Prolinstoffwechsels im tierischen Organismus

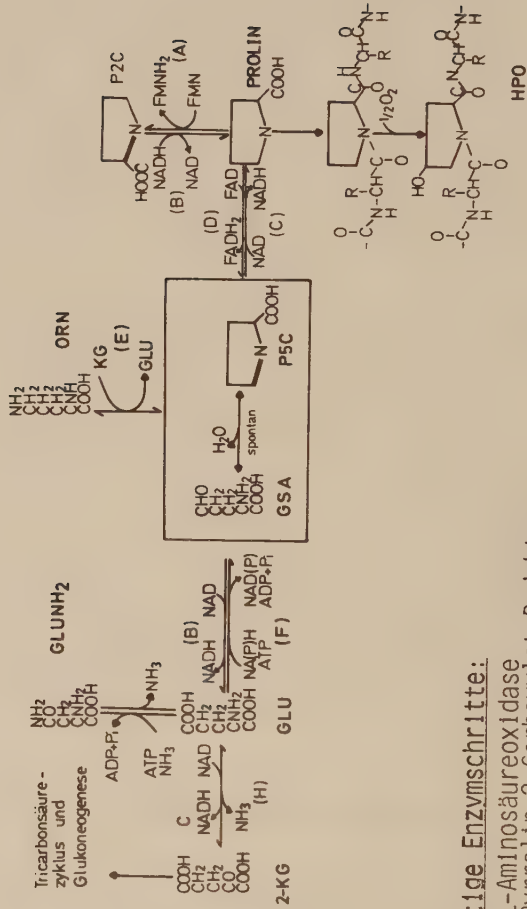
Prolin und Hydroxyprolin sind im tierischen Organismus nicht essentielle Aminosäuren (100), deren Bedeutung als Bindegewebsbausteine weithin bekannt ist (15, 53). Ihren hohen Anteil am Aufbau des Kollagenmoleküls erklärt man im allgemeinen mit der Fixation des Stickstoffatoms im Pyrrolidinring, wodurch diese Iminosäuren über die eingeschränkte Bewegungsfreiheit der Peptidbindung einen beträchtlichen Beitrag zur Steifheit von fibrillären Proteinen leisten (12). Trotz der hervorragenden Rolle von Prolin am Strukturaufbau des Extrazellulärraums ist über sein Schicksal im Säugerorganismus wenig bekannt. Bei Beginn dieser Arbeit lagen Befunde vor, die der Niere eine besondere Bedeutung im Prolinstoffwechsel zuweisen. So ergaben Verlaufsmessungen bei Ratten nach intravenöser Injektion von C^{14} -markiertem Prolin eine höhere intrazelluläre Aktivität in der Niere als in der Leber, dem Muskel und dem Gehirn (33). Studien am Hund und Menschen zeigten außerdem, daß die Niere neben Glutamin, das als Stickstoffdonor über die Sekretion von Ammoniumionen mit der Regulation des Säure-Basenhaushaltes in Verbindung gebracht wird, Prolin von allen übrigen Aminosäuren am stärksten extrahiert (73, 88).

1.2. Enzymschritte des renalen Prolinstoffwechsels

Abb. 1 gibt einen Überblick über die heutigen Vorstellungen zum Prolinstoffwechsel in der Niere. Wenn auch die Stoffwechselbeziehungen zwischen Ornithin, Glutamat

Abbildung 1

Stoffwechselwege von L-Prolin in der Säugerniere



Wichtige Enzymschritte:

- (A) L-Aminosäureoxidase
- (B) Pyrrrolin-2-Carboxylat-Reduktase
- (C) Pyrrrolin-5-Carboxylat-Reduktase
- (D) Prolinoxidase
- (E) Ornithin-Ketosäure-Transaminase
- (F) Pyrrrolin-5-Carboxylat-Synthetase
- (G) Pyrrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase
- (H) Glutamat-Dehydrogenase

und Prolin seit langer Zeit beschrieben sind (85), so ist noch unklar, in welche Richtungen und mit welchen relativen Stoffwechselraten sich die Umwandlungsprozesse vollziehen (1, 48). Speziell in der Niere lassen sich zwar hohe Aktivitäten von Ornithin-Ketosäure-Aminotransferase und Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase demonstrieren (48), der Nachweis einer Netto-Prolinsynthese aus Ornithin und Glutamat, das als weiterer Pyrrolin-5-Carboxylat-Vorläufer gilt, ist aber noch nicht erbracht (1). Die Rolle von Pyrrolin-2-Carboxylat als Prolinvorstufe ist auch noch ungesichert (66, 67). Die Hydroxylierung zu 4-Hydroxyprolin, das sich in hoher Konzentration in Basalmembranen und anderen kollagenreichen Strukturen findet, erfolgt im tierischen Organismus an bereits peptidgebundenem Prolin (1).

Die Prolinabbauwege stellen formal Umkehrreaktionen der Prolinsynthese dar, werden aber von verschiedenen Enzymen katalysiert. Am besten untersucht ist die Prolinoxidase, die als Schlüsselenzym des Prolinabbaus gilt (52, 54, 55, 61). Dabei handelt es sich um einen mitochondrial gelegenen, membrangebundenen Enzymkomplex mit hoher Aktivität in der Niere, der vermutlich in einer Flavinadeninnukleotid-abhängigen Reaktion Prolin zu Pyrrolin-5-Carboxylat bzw. dessen Semialdehyd dehydriert (13, 68). Die Pyridinnukleotid-vermittelte Weiterreaktion zu Glutamat erfolgt durch die renal ebenfalls hochaktive Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase (48,86). Die Bedeutung der anderen Prolinabbauwege, der Transaminierung von Pyrrolin-5-Carboxylat zu Ornithin und der Dehydrierung von Prolin zu Pyrrolin-2-Carboxylat ist derzeit noch unsicher (48, 67).

So haben Untersuchungen an Nierenpräparationen neben Glukose, Glutamat und CO_2 nur einmal geringe Mengen Ornithin als Prolinabbauprodukte identifizieren können (33, 34, 50, 57).

2. Eigene Fragestellung

Aufgrund der in der Literatur vorliegenden Daten versuchten wir mit unseren Untersuchungen folgende Fragen zu beantworten:

1. Was sind die Produkte des Prolinstoffwechsels in der Niere?
2. Welche Stellung nimmt Prolin im oxidativen Stoffwechsel der Niere ein?
3. Welche Wechselwirkungen bestehen zwischen Prolin und Substraten des Energiestoffwechsels und der Glukoneogenese?
4. An welche anatomische Struktur des Nephrons ist der Prolinstoffwechsel gebunden?
5. Wird der renale Prolinstoffwechsel ähnlich wie der des Glutamins durch Säure-Basenschiebungen reguliert?

Um unsere Untersuchungen mit denen der Literatur vergleichen zu können, wählten wir die Ratte als Versuchstier, bei der die meisten Befunde zum Nierenstoffwechsel vorlagen.

3. Besprechung der eigenen Ergebnisse und Diskussion

3.1. Prolinstoffwechsel in isolierten Nierentubuli

3.1.1. Abhängigkeit der Glukose-, Glutamat- und Ammoniakbildung aus Prolin von der Inkubationszeit

Inkubiert man isolierte Tubulussuspensionen von Hungerratten mit 10 mM Prolin über 60 Minuten, so beobachtet man eine lineare Glukoneogenese- und Ammoniakbildung über die gesamte Inkubationszeit, während die Glutamatbildungskurve nach 30 Minuten gering abflachte (Abb.2). Die Glukosebildung war nach 60 Minuten gegenüber der Kontrolle fast verdreifacht und die Ammoniakbildung verdoppelt. Die Glutamatbildung hatte sich in Anwesenheit von Prolin gegenüber der Kontrolle nach einer Stunde vervierfacht.

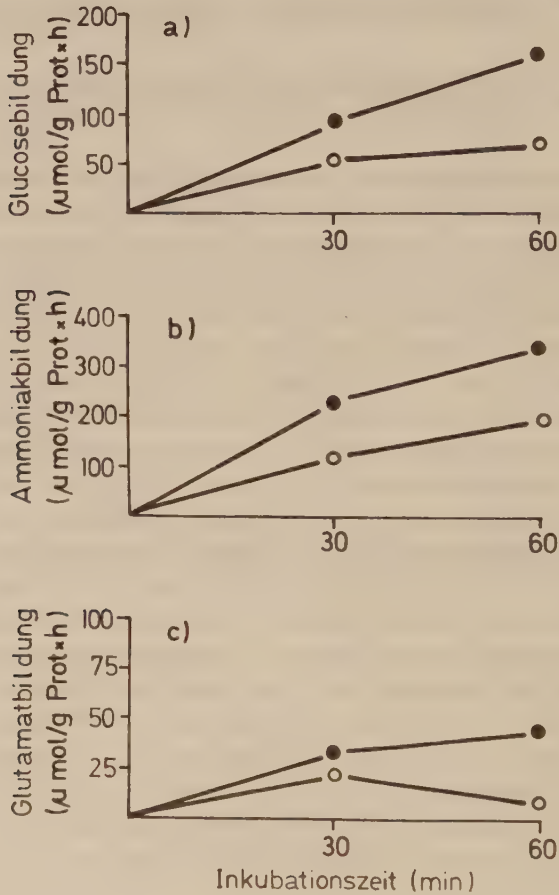
3.1.2. Abhängigkeit der Glukose-, Ammoniak- und Glutamatbildung von der Prolinkonzentration

Nachdem wir die Linearität der Produktbildungsraten über 60 Minuten abgesichert hatten, inkubierten wir Tubulusfragmente von Hungerratten über eine halbe Stunde, um die Abhängigkeit der Metabolitbildung von der Substratkonzentration zu studieren (Abb.3). Während die Glutamatbildung keine typische Sättigungskinetik zeigte, wurde die Sättigung der Glukoneogenesekapazität und Ammoniakbildung bei 5 mM bzw. 10 mM Prolinkonzentration erreicht.

Dieser Befund könnte für die physiologische Regulation der Glukoneogeneserate von Bedeutung sein, da die arterielle Prolinkonzentration unterhalb der graphisch ermittelten halbmaximalen Glukoneogenesekapazität von 1 mM liegt. Überträgt man diesen Befund auf die Situation in vivo, so würden demnach bereits geringe Veränderungen der Substratkonzentration im Serum zu einer Veränderung der Prolinaufnahme und Glukoneogeneserate führen (34).

Abbildung 2

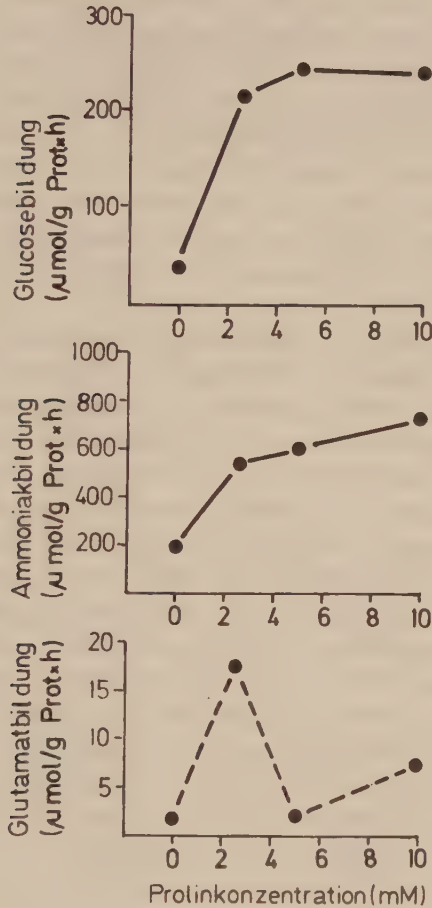
Abhängigkeit der Glukose-, Ammoniak- und Glutamatbildung aus Prolin von der Inkubationszeit



Isolierte Tubuli von Hungerratten wurden mit (●) und ohne (○) 10 mM Prolin nach der unter 6.6 beschriebenen Methode über 30 und 60 Minuten inkubiert und die a) Glukose-, b) Ammoniak- und c) Glutamatbildung gemessen.

Abbildung 3

Abhängigkeit der Glukose-, Ammoniak- und Glutamatbildung von der Prolinkonzentration



Isolierte Tubuli wurden mit verschiedenen Prolinkkonzentrationen über 30 Minuten inkubiert und die a) Glukose-, b) Ammoniak- und c) Glutamatbildung gemessen.

3.1.3. Bilanz des Kohlen- und Stickstoffwechsels von Prolin in isolierten Nierenrindentubuli

Hatten Experimente mit Nierenpräparationen bis zum Beginn dieser Arbeit zeigen können, daß beim Prolinabbau Glukose, Glutamat, Ornithin und CO_2 (33, 34, 50, 57) anfallen, so machten diese Untersuchungen keine Angaben zum Prolinverbrauch, dessen Kenntnis für eine Bilanzierung des Stoffwechselsgeschehens unbedingt erforderlich ist. Unsere Studien hatten außer der Bestimmung der Prolinaufnahme zum Ziel, bislang noch nicht beschriebene potentielle Prolinabbauprodukte zu erfassen.

Zur Messung des Prolinverbrauchs bot sich eine von Chinard entwickelte chemische Methode der Prolinbestimmung an, die sich aufgrund ihrer raschen und einfachen Durchführbarkeit für die Analyse einer großen Probenanzahl empfahl (19). Die Methode basiert auf einer charakteristischen roten Farbbildung von Prolin, Cystein, Ornithin, Lysin und Hydroxylysin in essigaurer Ninhydrinlösung (90). Da die endogenen Konzentrationen der interferierenden Aminosäuren um etwa einen Faktor 100 geringer sind als die Prolinkonzentrationen in unseren Versuchen, verzichteten wir im weiteren Verlauf der Arbeit auf die von Troll und Lindsley (90) beschriebene Extraktion dieser Substanzen durch Ausschütteln mit Permutit, einer Kaolin-Quarz-Natriumbicarbonat-Schmelze. Zu jedem Experiment erstellten wir einen Standard, der in einem Konzentrationsbereich von 10-500 nmol/l Prolin eine lineare Extinktion bei $E=515 \text{ nm}$ zeigte.

Bereits nach den ersten Versuchen stellten sich die Nachteile dieser Methode heraus, die deren weitere Verwendung limitierten. Die gewebefreien Standards zeigten durchgehend eine um 10-20% stärkere Farbbildung an als die nicht inkubierten Tubuluspräparationen. Daneben nahm bei einer

Tabelle 1

Wirkung von 5 mM Prolin auf den Aminosäurestoffwechsel in isolierten Tubuli

Aminosäure	Bildungsrate($\mu\text{mol/g Prot.} \times 60 \text{ Min.}$)		Differenz
	mit Prolin	ohne Prolin	
Phenylserin	0	+ 0,1	
Taurin	- 0,4	- 0,7	
Hydroxyprolin	- 31,4	- 30	
Threonin	+ 18,4	+ 14,8	
Serin	+ 49,8	+ 36, 1	+ 13,7
Asparagin	+ 15,2	+ 13	
Glutamin	+ 48	- 2	+ 50
Prolin	- 413	- 101	- 312
Glycin	+ 16,6	+ 23,1	
Alanin	+ 23,1	+ 15,9	+ 7,2
Valin	+ 20,6	+ 13	
Cystein	+ 2,9	0	
Methionin	+ 7,2	+ 4,3	
Isoleucin	+ 13,4	+ 8,7	
Leucin	+ 21,7	+ 12,6	
Tyrosin	+ 10,1	+ 7,2	
Glutamat	+ 5	- 2,9	+ 7,9
Ornithin	+ 1,7	- 0,9	+ 2,6
Lysin	+ 12,6	+ 9	
Histidin	+ 7,9	- 2,7	
Arginin	+ 6,5	- 2,9	
Phenylalanin	+ 11,9	+ 9,4	

Isolierte Tubuli (2,8 mg Tubulusprotein) von Hungerratten wurden über 60 Minuten mit und ohne 5 mM Prolin inkubiert. Glutamin, Glutamat und 2-Ketoglutarat wurden mit enzymatischen Methoden bestimmt. Prolin und alle anderen Aminosäuren wurden nach chromatographischer Trennung gemessen. Für experimentelle Details siehe methodischen Anhang.

+ Konzentrationszunahme, - Konzentrationsabnahme

Tabelle 2

Kohlenstoff- und Stickstoffbilanz von Prolin in isolierten Tubuli der Rattennier

KOHLNSTOFFBILANZ

STICKSTOFFBILANZ

Angaben in $\mu\text{mol/g}$ Protein $\times$ 60 Minuten

Endogene Bildungs- raten berücksichtigt	nein	ja	Endogene Bildungs- raten berücksichtigt	nein	ja
Prolinaufnahme	413	312	Prolinaufnahme	413	312
Metabolitbildung			Metabolitbildung		
Glukose (x2)	194	120	Glutamat	4	8
Glutamat	5	8	Glutamin (x2)	96	100
2-Ketoglutarat	9	4	Ammoniak	237	99
Serin	50	14	Serin	50	14
Alanin	23	7	Alanin	23	7
Glutamin	48	50			
nicht wiedergefunden	84	109	nicht wiedergefunden	2	84

Aliquots von 2,8mg Tubulusprotein gehungerter Ratten wurden mit und ohne Prolin über 60 Minuten inkubiert. Für experimentelle Details siehe Tab. 1 und methodischen Anhang.

Um alle Stoffwechselraten in Prolinäquivalenten darstellen zu können (vgl. auch Abb.4), wurde die Glukosebildung in der Kohlenstoffbilanz und die Glutaminbildung in der Stickstoffbilanz mit 2 multipliziert.

Reihe von Proben die Extinktion während der Inkubation zu, wofür vermutlich die unspezifische Mitreaktion von Prolinabbauprodukten wie Pyrrolin-5-Carboxylat mit dem Ninhydrin-Reagenz verantwortlich war (48). Schließlich war die Präzision der Methode mit einer relativen Standardabweichung von 14% um den Mittelwert für unsere Zwecke nicht ausreichend.

Um wenigstens einige vorläufige Daten zur Bilanz des renalen Prolinstoffwechsels zu erhalten, nutzten wir die Gelegenheit, die Prolinaufnahme mit Hilfe eines Aminosäureanalysers bestimmen zu lassen.* Dabei zeigte sich, daß aus Prolin nur Glutamin, Serin, Glutamat und Alanin in nennenswerten Mengen gebildet werden (Tab.1). Andere Aminosäuren ließen keine durch Prolin bedingten Konzentrationsänderungen erkennen.

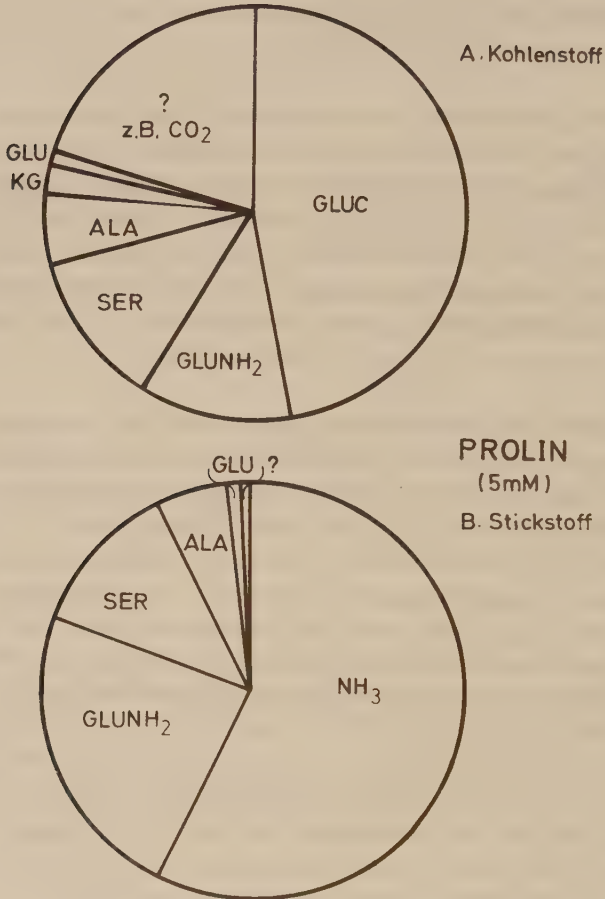
Da wir nicht wußten, inwieweit eine Prolinzugabe das endogene Stoffwechselgeschehen z.B. die Glukoneogenese oder den proteolytischen Abbau hemmte, berechneten wir die Prolinbilanz auf zweierlei Arten (Tab.2): Einmal zogen wir die Nullwerte von den 60 Minuten-Werten mit Prolin ab (unkorrigierte Bilanz), das andere Mal gingen wir davon aus, daß die endogenen Bildungsraten durch die Prolinzugabe nicht beeinflußt werden, und wir subtrahierten die 60 Minuten-Proben ohne Prolin von denen mit Prolin (korrigierte Bilanz).

Unabhängig vom Bilanzierungsmodus war Glukose mit 38% bzw. 47% des aufgenommenen Prolins der wichtigste Kohlenstoffmetabolit des renalen Prolinstoffwechsels. Alle anderen Produkte trugen zusammen nur 27-33% zur Kohlenstoffbilanz bei. Dabei überraschte uns besonders die starke Bildung von Glutamin, das als Prolinmetabolit in der Niere noch nicht beschrieben war und dessen Bedeutung sich besonders aus der Stickstoffbilanz able-

* Für die Durchführung der Aminosäureanalyse möchte ich Frll. Drodleff und Herrn Prof.Dr.G. Dietze danken.

Abbildung 4

Kohlenstoff- und Stickstoffbilanz von Prolin in isolierten Tubuli



Isolierte Tubuli von Hungerratten wurden mit 5mM Prolin über 60 Minuten inkubiert. Durch Messung der Prolin- und Metabolitkonzentrationen vor und nach der Inkubation wurden der Prolinverbrauch und die Produktbildungsrate ermittelt. Für experimentelle Details siehe Tab. 1 und methodischen Anhang

sen läßt. Obwohl in der unkorrigierten Stickstoffbilanz die Ammoniakbildung mehr als 50% des aufgenommenen Prolins ausmacht und damit die Glutaminproduktion um mehr als das Doppelte übertrifft, ist bei Berücksichtigung der endogenen Prozesse erkennbar, daß sich möglicherweise ein Teil der Ammoniakbildung auf Prolin zurückführen läßt. Dagegen stammt das Glutamin ausschließlich aus dem Prolinstickstoff. Wie beim Ammoniak so spielt die endogene Bildungskomponente auch bei Serin, Alanin und 2-Ketoglutarat eine erhebliche Rolle (Tab.2, Abb.4). Im Gegensatz zu einer Untersuchung mit menschlichen Nierenrindenschnitten häufte sich bei unserem Versuch nur eine geringe Menge Glutamat an (50). Nur maximal 35% des aufgenommenen Prolinstickstoffs wurden wahrscheinlich vollständig oxidiert; ebenso wurde nur 5-27% des aufgenommenen Stickstoffs nicht wiedergefunden.

Die hohe Wiederfindungsrate steht im Einklang mit früheren Untersuchungen, die zeigen konnten, daß unter allen Bedingungen und bei allen untersuchten Spezies die Substrataufnahme das renale Energiebedürfnis übersteigt (22, 38, 96). Dabei repräsentiert Glukose wie bei allen anderen Studien mit glukogenen Substraten auch in unserem Versuch das Hauptprodukt des Rinstoffwechsels (30, 38, 42).

Im Gegensatz zu Experimenten mit C^{14} -markiertem Prolin an menschlichen Nierenrindenschnitten, wo sich bis zu 66% des aufgenommenen Prolins als Glutamat identifizieren lassen (50), stellt in unserem Versuch an der Rattenniere Glutamat gegenüber Glutamin kein wesentliches Produkt des Prolinstoffwechsels dar.

Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise mit der arteigenen Enzymausstattung des Rattenephrons erklären (16), das anders als bei Menschen im proximalen

geraden Tubulus hohe Aktivitäten von Glutamin-Synthetase aufweist (62). Ein Teil des Glutamins, das beim Prolinabbau anfällt, könnte somit bei der Ratte zu Glutamin aminiert werden.

3.2. Wechselwirkungen zwischen Prolin und anderen Energiesubstraten des Nierenstoffwechsels

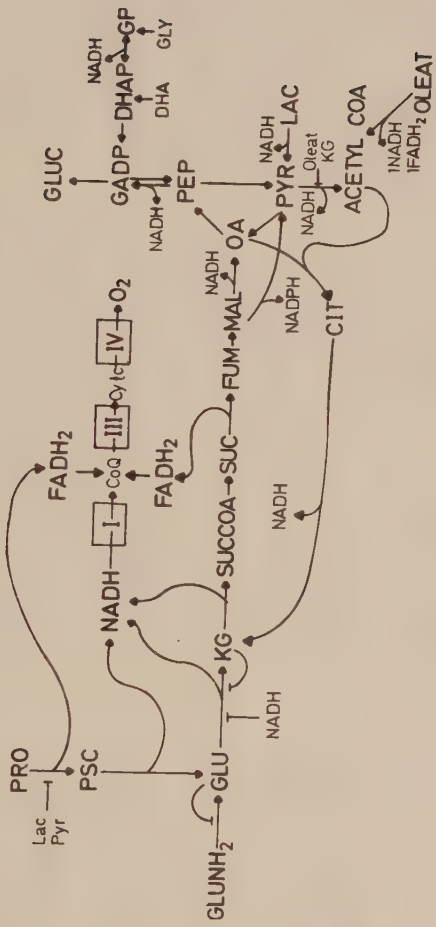
Substratwechselwirkungen an in vitro-Modellen der Niere schenkte man in den letzten Jahren eine größere Aufmerksamkeit, da mit Substratkombinationen häufig andere Stoffwechselraten beobachtet werden als mit den jeweiligen Einzelsubstanzen. So steigern beispielsweise Ketonkörper und Fettsäuren die Glukosebildung aus Laktat (51). Neben der Hemmung der Laktataufnahme inhibieren Fettsäuren außerdem die Aufnahme von Glutamin und Glutamat sowie die Ammoniak- und Glukosebildung aus diesen Substraten (41, 92). Umgekehrt stimulieren Glutamin und Laktat die Oleataufnahme und Triglyceridbildung (41, 99).

Wir wählten Oleat, Glutamin und Laktat, da sie als wichtige energieliefernde Substrate der Niere gelten. Glutamin wird als der hauptsächliche Vorläufer des Harnammoniaks angesehen (73), Laktat gilt als das glukoneogenetische Substrat, das im Körper am meisten zur Verfügung steht, und Oleat dient wahrscheinlich als bevorzugter Brennstoff der Nierenrinde (96). Pyruvat, Dihydroxyaceton und die Krebszyklus-Intermediate 2-Ketoglutarat und Succinat sind wie Prolin und Laktat ausgezeichnete Vorläufer der renalen Glukoneogenese (34).

Ziel unserer Untersuchung war es, die Stellung von Prolin in der Substrathierarchie der Niere von Hungerratten näher zu definieren (Abb.5).

Abbildung 5

Wechselbeziehungen von Prolin mit anderen Energiesubstraten der Nierenrinde auf der Ebene des Wasserstoffs



Das Schema gibt einen Überblick über die wichtigsten Wechselbeziehungen von Prolin mit anderen Energiesubstraten der Nierenrinde. $\rightarrow$ = Hemmung

3.2.1. Oleat und Prolin

Oleat führte nur zu einer geringfügigen Steigerung des Prolinverbrauchs (Tab.3). Eine statistisch signifikante Wirkung dieser Fettsäure auf die Ammoniak- und Glutamatbildung aus Prolin ließ sich nicht nachweisen. Dagegen wurde die Glukoneogenese aus Prolin durch Oleat um 33% gehemmt, während eine Einzelmessung des Mediumglutamins in Anwesenheit von Oleat keine Veränderung gegenüber der Kontrolle erbrachte. Prolin steigerte in Übereinstimmung mit einer früheren Untersuchung die Neutralfettbildung aus Oleat (99).

Die Hemmung der Glukoneogenese aus Prolin durch Oleat bei unveränderter Ammoniakbildung deutet auf eine Wechselbeziehung auf der Stufe nach der Deaminierung hin (Abb.5). Eine ähnliche Hemmung der Glukosebildung läßt sich mit Glutamat (38) und Glutamin (41), aber nicht mit Pyruvat oder Laktat (38) nachweisen. Eine mögliche Erklärung bietet die unterschiedliche Energiebilanz der Glukoneogenese aus diesen Substraten. Während die Glukosebildung aus Laktat und Pyruvat Energie verbraucht (6 Mol ATP pro Mol Glukose), fällt bei der Glukoneogenese aus C_5 -Substraten ein Energieüberschuß an. Dies gilt ganz besonders für Prolin, wie eine vergleichende Energiebilanz der Glukoneogenese aus Laktat, Glutamin und Prolin zeigt (Tab. 4).

Beobachtet man aus Glutamin in Anwesenheit von Oleat eine deutliche Hemmung der Ammoniakbildung (41), so läßt sich dieser Effekt des Oleats mit Prolin nicht nachweisen. Ebenso überraschend scheint der Befund der nicht gesteigerten Glutamatspiegel durch Oleat zu sein. Dies spricht gegen eine Hemmung des Prolinstoffwechsels auf der Stufe der Glutamat-Dehydrogenase durch NADH, wie es Untersuchungen an Leberzellen postulieren (46,47).

Tabelle 3

Wechselwirkungen zwischen Oleat und Prolin in isolierten Tubuli gehungelter Ratten

	endogen	Prolin (5 mM)	Oleat (1 mM)	Prolin + Oleat	Prolineffekt	Oleateffekt
Prolinaufnahme		414 (1)		449 (1)		+ 35
Triglyceridbildung			19 (1)	39 (1)	+ 20	
Ammoniakbildung	133+2 (4)	238+86 (4)	126+37 (4)	217+67 (4)	+91+49 ^a	-21+51 ^{n.s.}
Glutamatbildung	20+37 (4)	20+17 (4)	2+6 (4)	26+8 (4)	+24+14 ^a	+6+9 ^{n.s.}
Glukosebildung	41+3 (4)	148+34 (4)	23+4 (4)	98+32 (4)	+75+32 ^b	-50+22 ^b
Glutaminbildung		48 (1)		44 (1)		-4

Alle Angaben in $\mu\text{mol/g Prot.} \times 60 \text{ Minuten}$

Isolierte Tubulusfragmente von Hungerratten wurden über 60 Minuten in Krebs-Henseleit-Puffer inkubiert. Oleat wurde als klarer Albuminkomplex angeboten: Die Ansätze mit Prolin enthielten gleiche Mengen. Zu jedem Versuch wurde der Prolineffekt (Oleateffekt) durch Vergleich der Stoffwechselraten in Anwesenheit von Prolin und Oleat mit dem in Anwesenheit von Oleat (Prolin) ermittelt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + Standardabweichung mit der Anzahl der Versuche in Klammern wiedergegeben.

n.s. = nicht signifikant

^a2p<0,05^b2p<0,02

Tabelle 4

Energiebilanz bei der Glukoneogenese aus ausgesuchten Nierensubstraten

Substrat	Glutamin	Glutamat	Pyruvat	Oxalacetat	Phosphoenolpyruvat	0,5 - Glukose
Prolin	$ \begin{array}{c} \text{Prolin} \\ \downarrow \text{1 FADH}_2 \\ \downarrow \text{1 NADH} \\ \text{Glutamat} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{Glutamat} \\ \downarrow \text{1 NH}_3 \\ \downarrow \text{1 NADH} \\ \text{2-Ketoglutarat} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{Pyruvat} \\ \downarrow \text{1 ATP} \\ \downarrow \text{1 CO}_2 \\ \text{Oxalacetat} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{Oxalacetat} \\ \downarrow \text{1 GTP} \\ \downarrow \text{1 CO}_2 \\ \text{Phosphoenolpyruvat} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{Phosphoenolpyruvat} \\ \downarrow \text{1 ATP} \\ \downarrow \text{1 NADH} \\ \text{0,5 - Glukose} \end{array} $	
Laktat			$ \begin{array}{c} \text{Pyruvat} \\ \downarrow \text{1 ATP} \\ \downarrow \text{1 CO}_2 \\ \text{Oxalacetat} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{Oxalacetat} \\ \downarrow \text{1 GTP} \\ \downarrow \text{1 CO}_2 \\ \text{Phosphoenolpyruvat} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{Phosphoenolpyruvat} \\ \downarrow \text{1 ATP} \\ \downarrow \text{1 NADH} \\ \text{0,5 - Glukose} \end{array} $	

Theoretischer

ATP (GTP) - Gewinn

Mol/Mole Substrat

+ 12

7 +

Erklärung: $1 \text{ FADH}_2 \rightarrow 2 \text{ ATP}$, $1 \text{ NADH} \rightarrow 3 \text{ ATP}$

31

Dort wird ein Abfall der Glutamatbildung aus Prolin durch Zugabe von Entkopplern der Atmungskette beobachtet, während in Anwesenheit von Äthanol das Mediumglutamat wieder ansteigt. Vielmehr scheint Oleat die Glukosebildung aus Prolin auf einer mehr proximalen Stufe zwischen 2-Ketoglutarat und Glukose zu hemmen.

3.2.2. Glutamin und Prolin

Aus Glutamin wurde beinahe fünfmal mehr Ammoniak gebildet als aus Prolin (Tab.5). Mit 17% des aufgenommenen Glutamins stellte Glutamat ein in der Bilanz wichtiges Produkt dar. In Anwesenheit beider Substrate war die Glutamatbildung mehr als additiv gesteigert.

Im Gegensatz zur Glutamatbildung war die Glukosebildung aus Glutamin durch Prolin nicht additiv gesteigert. Die Glutaminaufnahme wurde durch Prolin um 36% und die Ammoniakbildung um 13% gehemmt.

Auch in Nierenrindenschnitten wird die Glutaminaufnahme durch Prolin gehemmt (2). Nach Ansicht der Autoren läßt sich diese Hemmung auf ein gemeinsames Transportsystem für Glutamin und Prolin an der Bürstensaummembran zurückführen.

Da ähnliche Befunde auch mit Glutamin und Laktat (20, 41), Glutamin und Pyruvat (51) und Glutamin und 2-Ketoglutarat (45) beobachtet werden, muß neben der Wirkung von Prolin auf den Glutamintransport noch ein zusätzlicher Stoffwechseleffekt in Betracht gezogen werden. Als möglicher Wirkungsmechanismus können sowohl die Wechselwirkungen beim mitochondrialen Transport (beide Substrate werden im Mitochondrium verstoffwechselt), als auch die auf der Ebene des Wasserstoffs erwogen werden. Zur Verdeutlichung der komplexen Zusammenhänge möge Abb. 5 dienen.

Tabelle 5

Wechselwirkungen zwischen Glutamin und Prolin in isolierten Nierentubuli von Hungerratten

	endogen	Prolin (5 mM)	Glutamin (5 mM)	Prolin + Glutamin	Prolin- effekt	Glutamin- effekt
Glutaminaufnahme			1236+448 (8)	791+377 (8)	-444+435 ^b	
Ammoniakbildung	133+2 (4)	305+216 (10)	1475+671 (10)	1284+522 (10)	-190+258 ^a	+979+396 ^c
Glutamatbildung	8+13 (4)	21+28 (10)	206+137 (10)	284+114 (10)	+77+115 ^{n.s.}	+263+107 ^c
Glukosebildung	41+3 (4)	149+51 (10)	216+72 (10)	248+72 (10)	+32+20 ^c	+99+37 ^c

Alle Angaben in $\mu\text{mol/g}$ Prot. x 60 Minuten

Isolierte Tubuli gehungerter Ratten wurden über 60 - 120 Minuten in Krebs-Henseleit-Medium inkubiert. Zu jedem Versuch wurden die Wirkungen von Prolin und Glutamin durch Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle des gleichen Versuchs ermittelt. Alle Werte repräsentieren Mittelwerte + Standardabweichung mit der Anzahl der Versuche in Klammern.

n.s. = nicht signifikant ^a $2p < 0,05$ ^b $2p < 0,025$ ^c $2p < 0,001$

Aufgrund der Verfügbarkeit von NADH aus der Prolinoxidation ist es durchaus möglich, daß die Glutamat-Dehydrogenase gehemmt wird (75). Dies würde den Anstieg des Glutamats durch Prolin erklären (Tab.5). Da Glutamat als potenter Inhibitor der phosphatabhängigen Glutaminsäure bekannt ist (24, 31, 60), ist damit die gehemmte Glutaminsäureaufnahme durch Prolin erklärt. Bei dieser Vorstellung wird jedoch nicht berücksichtigt, daß unter unseren Versuchsbedingungen nur ein kleinerer Teil des intrazellulären Glutamats in den Mitochondrien vorliegt und die mitochondriale Glutamatkonzentration nicht aus dem Gesamt-Glutamatgehalt errechnet werden kann (35).

Daß selbst die zelluläre Mikrokompartimentierung für die Regulation des Glutaminstoffwechsels von Bedeutung sein kann, demonstrieren Befunde von Schoolwerth und LaNoue (79) an Mitochondrien der Rattennierenrinde. Nach Ansicht dieser Autoren existieren zwei verschiedene intramitochondriale Glutaminspeicher: 1. Ein in der Nähe der inneren Mitochondrienmembran gelegener Glutamatpool, der vorwiegend Transaminasereaktionen zugänglich ist und 2. ein Glutamatreservoir, das mit der Glutaminsäure in enger räumlicher Beziehung steht. Dieses Glutamat wird größtenteils durch die Glutamat-Dehydrogenase oxidativ deaminiert. Die beiden Glutamatpools sollen trotz der räumlichen Trennung miteinander im Wettbewerb liegen. Da die Prolinoxidase wahrscheinlich fest an die innere Mitochondrienmembran gebunden ist (14), wäre es denkbar, daß das beim Prolinabbau entstehende Glutamat in den Glutamatpool einfließt, der in der Nähe dieser Membran lokalisiert ist. Das 2-Ketoglutarat, das dabei durch Transaminierung entsteht, gilt wiederum als starker Hemmer der Glutamat-Dehydrogenase, die über einen Anstieg des Glutamat-Glutaminsäure-Spiegels letztlich die Aktivität der Glutaminsäure senken könnte (Abb. 5). Schließlich kann zytosolisch 2-Ketoglutarat, das aus Prolin entsteht, kompetitiv den mitochondrialen Transport von Glutamin hemmen (32).

Tabelle 6

Wechselwirkungen zwischen 2-Ketoglutarat und Prolin in isolierten Nierentubuli von Hungerratten

	endogen	Prolin (5 mM)	2-Ketoglutarat (5 mM)	Prolin + 2-Ketoglutarat	Prolin- effekt	2-Ketogluta- rateffekt
2-Ketoglutarat- aufnahme			465 $\pm$ 136 (10)	698 $\pm$ 191 (10)	+233 $\pm$ 152 ^d	
Ammoniakbildung	133 $\pm$ 2 (4)	229 $\pm$ 82 (10)	41 $\pm$ 69 (10)	139 $\pm$ 107 (10)	+98 $\pm$ 86 ^a	-89 $\pm$ 82 ^b
Glutamatbildung	8 $\pm$ 13 (4)	12 $\pm$ 20 (8)	12 $\pm$ 15 (8)	68 $\pm$ 35 (8)	+56 $\pm$ 42 ^b	+56 $\pm$ 27 ^c
Glukosebildung	41 $\pm$ 3 (4)	134 $\pm$ 27 (10)	141 $\pm$ 58 (10)	266 $\pm$ 75 (10)	+126 $\pm$ 39 ^c	+132 $\pm$ 64 ^c

Alle Angaben in $\mu\text{mol/g Prot} \times 60 \text{ Minuten}$

Isolierte Tubuli aus Nierenrinden gehungerter Ratten wurden über 60 Minuten in Krebs-Henseleit-Medium inkubiert. Zu jedem Versuch wurden die Wirkungen von Prolin und 2-Ketoglutarat durch Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle des gleichen Versuchs ermittelt. Alle Werte repräsentieren Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung mit der Anzahl der Versuche in Klammern.

^a2p < 0,02^b2p < 0,01^c2p < 0,005^d2p < 0,001

3.2.3. 2-Ketoglutarat und Prolin

Bei Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß 2-Ketoglutarat von der Niere stärker aufgenommen wird als von allen anderen Organen (22). Da der Prolinkohlenstoff auf dem Weg zu Glukose auf der Stufe von 2-Ketoglutarat in den Krebszyklus eingeschleust wird, erschien es uns lohnend, die Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Substraten zu untersuchen.

Die Ammoniakbildung aus endogenen Quellen und aus Prolin wurde durch 2-Ketoglutarat stark gehemmt (Tab.6), während sich mit beiden Substraten im Ansatz die Glutamatspiegel um mehr als 500% gegenüber den Kontrollen erhöhte. Die Glukosebildung aus beiden Substraten war additiv. Prolin stimulierte die 2-Ketoglutarataufnahme um 50%.

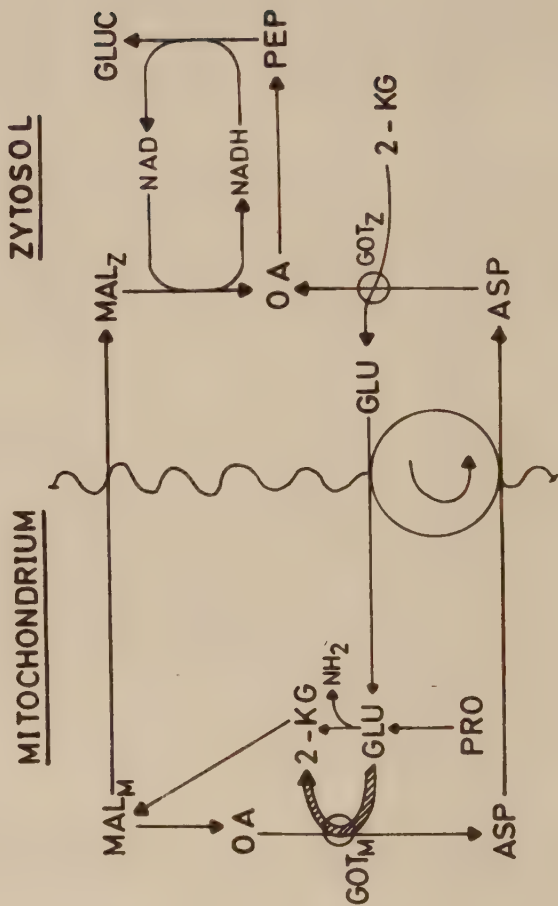
Die gesteigerte 2-Ketoglutarataufnahme und Glukosebildung bei verminderter Ammoniakbildung in Anwesenheit von 2-Ketoglutarat und Prolin deuten auf eine katalytische Prolinwirkung auf den 2-Ketoglutaratstoffwechsel hin. Tatsächlich läßt sich beinahe die gesamte zusätzlich gebildete Glukose in Gegenwart beider Substrate gegenüber 2-Ketoglutarat als Kontrolle durch die vermehrte 2-Ketoglutarataufnahme erklären (vermehrte 2-Ketoglutarataufnahme: vermehrte Glukosebildung = 1 : 1,9). Einen ähnlichen Befund konnte Friedrichs für Lysin und 2-Ketoglutarat an isolierten Tubuluszellen erheben (30).

Folgender Mechanismus könnte für die gesteigerte 2-Ketoglutarataufnahme und Glukosebildung aus 2-Ketoglutarat durch Prolin eine Rolle spielen:

Nach der geltenden Vorstellung muß 2-Ketoglutarat zunächst ins Mitochondrium transportiert werden (Abb.6). Dies kann in Form von 2-Ketoglutarat wie in Form von Glutamat geschehen. Prolin würde diesen Eintritt in Form von Glutamat stimulieren, da es Aspartat als Gegenion bildet.

Abbildung 6

Hypothetischer Mechanismus der Wechselwirkungen zwischen 2-Ketoglutarat und Prolin



Stimulierung des Aspartat-Malat-Shuttles durch Prolin über ein vermehrtes Aspartatangebot würde in diesem Fall zu einer zusätzlichen Bildung von Oxalacetat im Zytosol führen. Dies hätte einen gesteigerten Flux durch die Phosphoenol-Carboxykinase-Reaktion und schließlich eine Stimulierung der Glukoneogenese zur Folge.

3.2.4. Succinat und Prolin

Die Wechselbeziehungen zwischen Prolin und Succinat erschienen uns aus mehreren Gründen interessant: Einmal ist Succinat ein ausgezeichnetes Substrat der renalen Glukoneogenese (34). Zum anderen ist Succinat ein Intermediat des Prolins auf dem Weg zu Glukose. Schließlich ist bei Prolin und Succinat der erst Oxidationsschritt an ein Flavinadeninnukleotid gekoppelt (Abb.5).

Im Gegensatz zu 2-Ketoglutarat zeigte Succinat keine hemmende Wirkung auf den Ammoniakstoffwechsel der Tubuli (Tab.7). Wurden Succinat und Prolin gemeinsam inkubiert, so waren die Glutamatspiegel gegenüber den Kontrollen mehr als additiv gesteigert. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen bildete Succinat mehr Glukose als Prolin (34); die Glukoneogeneserate in Anwesenheit von Prolin und Succinat war jedoch höher als mit nur einem Substrat, die Effekte jedoch nicht voll additiv.

Die weniger als additiv gesteigerte Glukosebildung weist darauf hin, daß sich Prolin und Succinat ähnlich wie Prolin und Glutamin oder Prolin und Oleat auf der Ebene des mitochondrialen Energiestoffwechsels beeinflussen. Dabei könnte der Befund einer durch Succinat nicht gehemmten Ammoniakbildung aus Prolin als zusätzliches Indiz herangezogen werden, daß in der Hierarchie des renalen Substratstoffwechsels Prolin und Succinat auf der gleichen Stufe stehen.

Tabelle 7

Wechselwirkungen zwischen Succinat und Prolin in isolierten Nierentubuli von Hungerratten

	endogen	Prolin (5 mM)	Succinat (5 mM)	Prolin + Succinat	Prolin- effekt	Succinat- effekt
Ammoniakbildung	133+2 (4)	200+54 (10)	127+76 (10)	218+76 (10)	+91+91 ^a	+18+72 ^{n.s.}
Glutamatbildung	8+13 (4)	17+14 (10)	36+72 (10)	84+66 (10)	+48+52 ^a	+67+70 ^a
Glukosebildung	41+3	132+30	213+77	276+86	+63+13 ^b	+143+72 ^b

Alle Angaben in $\mu\text{mol/g Prot.} \times 60 \text{ Minuten}$

Tubuluspräparationen aus Nierenrinden von Hungerratten wurden über 60 Minuten in Krebs-Henseleit-Medium inkubiert. Zu jedem Versuch wurden die Wirkungen von Prolin und Succinat durch Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle des gleichen Versuchs ermittelt. Alle Werte repräsentieren Mittelwerte + Standardabweichung mit der Anzahl der Versuche in Klammern.

^a $2p < 0,02$ ^b $2p < 0,001$ n.s. = nicht signifikant

Die Bildung von FADH_2 durch den Succinatabbau führt offenbar nicht zu einer Hemmung der Glutamat-Dehydrogenase-Reaktion, da der Ammoniak unverändert ist. Der Anstieg des Glutamats ist vielleicht durch eine Feedbackhemmung der 2-Ketoglutarat-Dehydrogenase bedingt. Die nahezu additive Wirkung beider Substrate als Glukoneogenesevorläufer könnte ähnlich wie bei 2-Ketoglutarat als Steigerung des Aspartat-Shuttles durch Prolin erklärt werden. Andererseits ist nicht auszuschließen, daß sich die Glukoneogenese aus Succinat mit Prolin teilweise in verschiedenen Abschnitten des proximalen Tubulus abspielt.

3.2.5. Laktat und Prolin

Der Prolinverbrauch wurde durch Laktat um 36% gehemmt (Tab.8). Noch stärker als 2-Ketoglutarat unterdrückte Laktat die Ammoniakbildung aus endogenen Quellen und aus Prolin. Dabei bildete sich in Gegenwart von Laktat etwa dreimal mehr Glutamat als Prolin ; die Bildungsrate in Anwesenheit beider Substrate war mehr als additiv. In Übereinstimmung mit früheren Befunden (40) war Laktat ein besseres Substrat der Nierenglukoneogenese als Prolin. Inkubierte man beide Substrate gemeinsam, so entsprach die Glukosebildung in etwa der Summe der Bildungs-raten der Einzelsubstanzen.

Prolin selbst übte einen 20% steigernden Effekt auf die Laktataufnahme aus. Im Gegensatz zu Untersuchungen an Tubuli vom Menschen und Hund (6,7) häufte sich in einem eigenen Versuch nur eine verschwindend geringe Alaninmenge an (weniger als $12 \mu\text{mol/g Prot.} \times 60 \text{ Min.}$).

Die Steigerung der Glukoneogeneserate bei stark verminderter Ammoniakbildung, wenn Prolin und Laktat gemeinsam inkubiert werden, wurde bereits von Friedrichs (30) an isolierten Nierentubuli beobachtet. Ähnliche Wirkungen von Laktat auf den Glutaminstoffwechsel der Niere wurden von anderen Untersuchern publiziert (41, 77).

Tabelle 8

Wechselwirkungen zwischen Laktat und Prolin in isolierten Nierentubuli von Hungerratten

	endogen	Prolin (5 mM)	Laktat (5 mM)	Prolin + Laktat	Prolin- effekt	Laktat- effekt
Prolinaufnahme		414 (1)		264 (1)		-150
Laktataufnahme			928 $\pm$ 204 (13)	1127 $\pm$ 285 (13)	+199 $\pm$ 72 ^c	
Ammoniakbildung	133 $\pm$ 2 (4)	227 $\pm$ 76 (13)	23 $\pm$ 41 (13)	18 $\pm$ 37 (13)	-4 $\pm$ 51 ^{n.s.}	-205 $\pm$ 91 ^d
Glutamatbildung	8 $\pm$ 18 (4)	13 $\pm$ 17 (12)	41 $\pm$ 79 (12)	72 $\pm$ 60 (12)	+30 $\pm$ 37 ^a	+58 $\pm$ 47 ^b
Glukosebildung	41 $\pm$ 3 (4)	131 $\pm$ 29 (13)	215 $\pm$ 63 (13)	325 $\pm$ 95 (13)	+110 $\pm$ 41 ^d	+194 $\pm$ 72 ^d

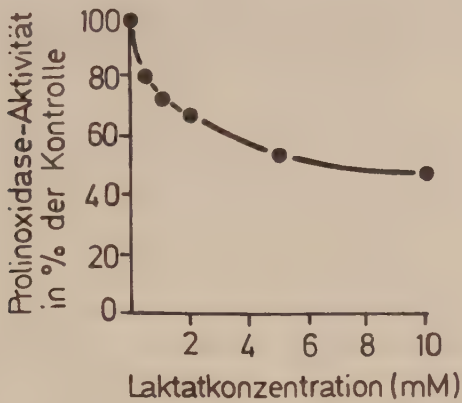
Alle Angaben in $\mu\text{mol/g Prot.} \times 60$ Minuten

Isolierte Tubuli von Nierenrinden gehungerter Ratten wurden über 60 Minuten in Krebs-Henseleit-Medium inkubiert.

Die Prolin- und Laktatwirkungen wurden durch Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle des gleichen Versuchs ermittelt. Alle Werte repräsentieren Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung mit der Anzahl der Versuche in Klammern.n.s. = nicht signifikant ^a $2p < 0,02$ ^b $2p < 0,05$ ^c $2p < 0,005$ ^d $2p < 0,001$

Abbildung 7

Hemmung der Prolinoxidase durch Laktat

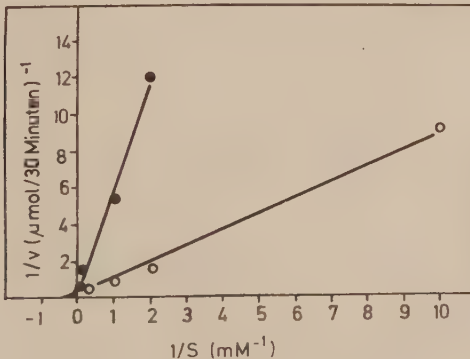


Nierenrinden einer Hungerratte wurden durch Pottern homogenisiert und eine Mitochondrienfraktion nach der unter 6.6 beschriebenen Methode hergestellt. Die Prolinoxidaseaktivität wurde mit o-Aminobenzaldehyd bestimmt, das mit Pyrrolin-5-Carboxylat einen Farbkomplex im sichtbaren Bereich bildet. Die Inkubation erfolgte über 30 Minuten bei 37°C.

Die Prolinkonzentration betrug 1 mM. Laktat wurde in verschiedenen Konzentrationen dem Medium zugesetzt. Die Werte repräsentieren das Mittel aus mindestens zwei Bestimmungen.

Abbildung 8

Enzymkinetik der Prolinoxidase-Hemmung durch Laktat



Für experimentelle Details siehe Legende zu Abb. 7

Die Abbildung zeigt ein Lineweaver-Burk Diagramm der reziproken Aktivität v gegen die reziproke Prolinkonzentration S . Die Kontrolle (○) und die Proben mit 5 mM Laktat (●) erreichten das gleiche $V_{\max}$ bei verschiedenen K_m -Werten.

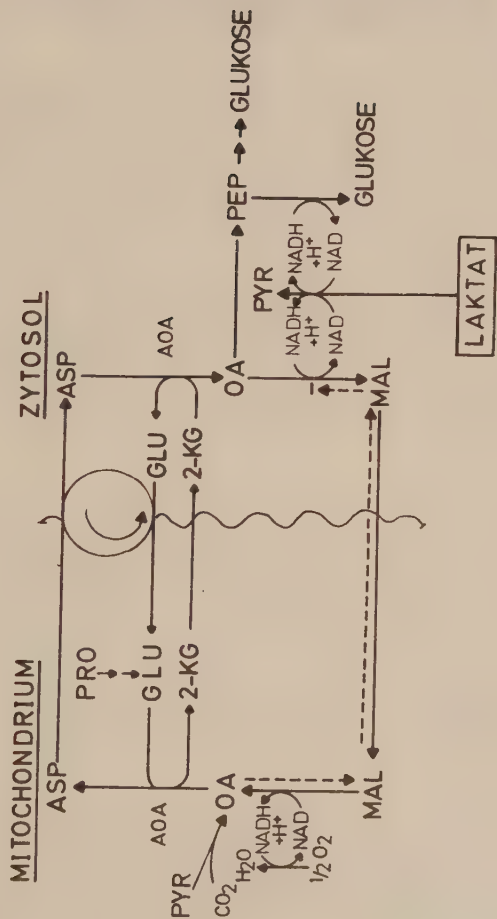
Die Hemmung der Prolinaufnahme in der Ammoniakbildung läßt sich eventuell mit einer direkten Wirkung von Laktat auf die Prolinoxidase erklären.

Abb. 7 zeigt die Wirkung steigender Laktatkonzentrationen auf die Aktivität der Prolinoxidase in einer Mitochondrienpräparation der Nierenrinde einer gehungerten Ratte. Tatsächlich ließ sich eine Hemmung der Enzymaktivität um 15% und 55% bei 1mM bzw. 10mM Laktat und einer Prolinkonzentration von 1mM im Ansatz beobachten. Wie aus einer Lineveawer-Burk-Analyse mit 5mM Laktat und steigenden Prolinkonzentrationen hervorgeht (Abb.8), steigerte Laktat über eine allosterische Regulation der Enzymaffinität die halbmaximale Substratkonzentration S_0 , ohne V_{max} zu verändern (kompetitiver Hemmungstyp).

Diese Ergebnisse bestätigen Befunde an der Leber und am Bakterium (55, 78) und deuten außerdem daraufhin, daß die Hemmung der Prolinoxidase durch Laktat im tierischen Organismus weithin verbreitet ist. Darüberhinaus ergibt sich aus unseren Stoffwechseluntersuchungen, daß die effektorische Hemmung des Prolinstoffwechsels durch Laktat auch in intakten Zellen von Bedeutung ist.

Da sich wie bei Prolin und 2-Ketoglutarat auch in Anwesenheit von Laktat und Prolin fast die gesamte Glukosebildung durch die gesteigerte Laktataufnahme (zusätzliche Laktataufnahme / vermehrte Glukosebildung = 1,8) erklären läßt, übt Prolin selbst wahrscheinlich eine katalytische Wirkung auf den Laktatstoffwechsel aus. Diese Interpretation würde im Einklang mit der bereits diskutierten Hypothese von früheren Untersuchungen stehen (30), welche die Wirkung von Lysin und anderen Aminosäuren, bei deren Abbau Glutamat anfällt, mit einer Stimulierung des tubulären Aspartat-Malat-Shuttles infolge einer gesteigerten Bereitstellung von Glutamat erklären (Abb.9).

Hypothetischer Mechanismus der Wechselwirkungen zwischen Laktat und Prolin



----- Stoffwechselfluss bei durch Aminoxyacetat gehemmten Transaminasen

Da die katalytische Steigerung der Glukoneogenese aus Laktat durch eine Transaminasehemmung aufgehoben werden kann (30), unternahmen wir noch Experimente mit Aminooxyacetat, einem spezifischen Transaminasehemmer, um den Mechanismus der Wechselbeziehungen zwischen Laktat und Prolin weiter abzuklären.

3.2.6. Einfluß einer Transaminasehemmung auf den Laktat- und Prolinstoffwechsel

In Gegenwart von 1 mM Aminooxyacetat sank die Laktataufnahme um mehr als 50% gegenüber der Kontrolle ab (Tab.9,B). Dagegen war die Ammoniakbildung noch über die endogenen Bildungsraten hinaus gesteigert, während die Glutamatspiegel in allen Ansätzen (Tab.9, B-D) durch Aminooxyacetatzusatz unbeeinflusst blieben. In Abwesenheit von Substrat hatte Aminooxyacetat keinen Einfluß auf die Ammoniakbildung. Die Wirksamkeit der Transaminasehemmung läßt sich an der Glukosebildungsrate ablesen: Sie war in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen um mehr als 75% reduziert (30, 76), (Abb.9).

Aus Tab. 9, C ist abzulesen, daß sich die Ammoniakbildung mit Prolin und Aminooxyacetat im Medium verdoppelt hat. Im Unterschied zur Laktatglukoneogenese ließ sich jedoch nur ein geringer Abfall der Glukosebildung aus Prolin beobachten. Dieser Befund weist darauf hin, daß in die Glukoneogenese aus Prolin im Gegensatz zu der aus Laktat die Transaminierungsreaktionen nicht essentiell eingeschaltet zu sein brauchen.

Die gegenüber der Kontrolle unveränderten Glutamatspiegel lassen außerdem vermuten, daß selbst unter Bedingungen, wo das gesamte Glutamat aus Prolin über die Glutamamat-Dehydrogenase verstoffwechselt wird, diese Enzymreaktion nicht der limitierende Schritt im renalen Prolinabbau zu sein scheint.

Tabelle 9

Wirkung einer Transaminasehemmung auf den Laktat- und Prolinstoffwechsel in isolierten Nierentubuli von Hungerratten

Stoffwechselraten in $\mu\text{mol/g Prot.} \times 60 \text{ Minuten}$			
	Kontrolle.	+Aminioxyacetat	Aminooxyacetat- effekt
A. ohne Substrat (n=4)			
Ammoniakbildung	133+2		
Glutamatbildung	8+18		
Glukosebildung	41+3		
B. Laktat (n=5)			
Laktataufnahme	932+225	447+177	-485+214 ^a
Ammoniakbildung	20+10	169+28	+149+15 ^c
Glutamatbildung	105+132	106+123	-1+16 ^{n.s.}
Glukosebildung	206+55	45+14	-161+57 ^a
C. Prolin (n=5)			
Ammoniakbildung	207+69	408+44	+201+64 ^b
Glutamatbildung	18+16	33+72	+14+79 ^{n.s.}
Glukosebildung	130+26	120+12	-10+23 ^{n.s.}
D. Prolin + Laktat (n=5)			
Laktataufnahme	1076+228	392+131	-684+116 ^c
Ammoniakbildung	23+36	172+25	+148+40 ^b
Glutamatbildung	112+68	119+88	+7+26 ^{n.s.}
Glukosebildung	315+55	58+15	-257+46 ^c

Tubulusfragmente von Nierenrinden gehungerter Ratten wurden über 60 Minuten in Gegenwart von 5 mM Prolin und /oder 5 mM Laktat mit und ohne 1 mM Aminooxyacetat inkubiert.

n.s. = nicht signifikant ^a_{2p}<0,005 ^b_{2p}<0,001 ^c_{2p}<0,0005

Tabelle 10

Wechselwirkungen zwischen Laktat und Prolin in Anwesenheit von Aminoxyacetat in isolierten Nierentubuli
 gehungelter Ratten

	Prolin (5 mM)	Laktat (5 mM)	Prolin + Laktat	Prolineffekt	Laktateffekt
Laktataufnahme		447 $\pm$ 177 (5)	392 $\pm$ 131 (5)	-55 $\pm$ 152 ^{n.s.}	
Ammoniakbildung	408 $\pm$ 44 (5)	169 $\pm$ 28 (5)	172 $\pm$ 25 (5)	-3 $\pm$ 40 ^{n.s.}	-236 $\pm$ 44 ^a
Glutamatbildung	33 $\pm$ 72 (5)	106 $\pm$ 123 (5)	119 $\pm$ 88 (5)	-13 $\pm$ 44 ^{n.s.}	+86 $\pm$ 73 ^{n.s.}
Glukosebildung	120 $\pm$ 12 (5)	45 $\pm$ 14 (5)	58 $\pm$ 15 (5)	+13 $\pm$ 5 ^b	-52 $\pm$ 14 ^a

Alle Angaben in $\mu\text{mol/g Prot.} \times 60$ Minuten

Isolierte Nierentubuli von Hungerratten wurden über 60 Minuten in Krebs-Henseleit-Medium in Anwesenheit von Prolin und /oder Laktat und 1 mM Aminoxyacetat inkubiert. Zu jedem Versuch wurden die Wirkungen von Prolin und Laktat mit der Kontrolle des gleichen Versuchs ermittelt. Alle Werte repräsentieren Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung mit der Anzahl der Versuche in Klammern.

n.s. = nicht signifikant ^a $2p < 0,001$ ^b $2p < 0,01$

Inkubierten wir beide Substrate gemeinsam (Tab.9, B), ließen sich in Anwesenheit von Aminoxyacetat bei allen untersuchten Stoffwechselfparametern fast die gleichen Bildungsraten bzw. Metabolitveränderungen beobachten, wie wir sie in unseren Experimenten mit Laktat allein ohne Prolin gesehen hatten (Tab.9, B+D): Die Laktataufnahme und Glukoneogeneserate waren stark vermindert, während die Ammoniakbildung mehrfach gesteigert und die Glutamatspiegel unverändert waren.

Betrachtet man Tab. 10, wo die Wechselbeziehungen zwischen Laktat und Prolin in Anwesenheit von Aminoxyacetat noch einmal gesondert dargestellt sind, wird dieses Verhalten noch deutlicher. Ähnlich wie bei Lysin und Laktat (30) war die stimulierende Wirkung von Prolin auf die Laktataufnahme in Anwesenheit von Aminoxyacetat vollkommen aufgehoben. Auch die Glukoneogenese zeigte mit beiden Substraten nur eine geringe Zunahme, wobei die erzielte Glukosebildung weniger als die Hälfte von der mit Prolin betrug.

Da sich in Anwesenheit von Prolin und Laktat gegenüber Laktat als Kontrolle keine Veränderung des Ammoniakspiegels beobachten ließ und auch die Glutamatkonzentration nicht anstieg, spricht dies für eine Hemmung des Prolinstoffwechsels durch Laktat proximal zur Glutamat-Dehydrogenase. In Anbetracht der stark reduzierten Laktataufnahme scheint eine Hemmung infolge eines hohen mitochondrialen NADH/NAD-Quotienten weniger wahrscheinlich. Vielmehr bestätigen diese Befunde Experimente an der Rattenleber (55) und am Bakterium (78) sowie unsere eigenen Enzymstudien, die auf eine direkte und spezifische Hemmung der Prolinoxidase durch Laktat hindeuten.

Tabelle 11

Wechselwirkungen zwischen Pyruvat und Prolin in isolierten Nierentubuli von Hungerratten

	endogen	Prolin (5 mM)	Pyruvat (5 mM)	Prolin + Pyruvat	Prolineffekt	Pyruvateffekt
Pyruvataufnahme			2162+300 (7)	2169+282 (7)	+7+98 ^{n.s.}	
Ammoniakbildung	133+2 (4)	238+83 (13)	47+35 (13)	55+36 (13)	+7+26 ^{n.s.}	-184+68 ^c
Glutamatbildung	8+13 (4)	13+18 (10)	7+20 (10)	66+41 (10)	+59+31 ^c	+53+36 ^b
Glukosebildung	41+3 (4)	147+45 (13)	330+108 (13)	407+120 (13)	+77+31 ^c	+259+112 ^c
Alaninbildung		8 (1)	47 (1)	79	+32	

Alle Angaben in $\mu\text{mol/g Prot.} \times 60 \text{ Minuten}$

Isolierte Nierentubuli von Hungerratten wurden über 60 Minuten in Krebs-Henseleit-Medium inkubiert. Zu jedem Versuch wurden die Wirkungen von Prolin und Pyruvat durch Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle des gleichen Versuchs ermittelt. Alle Werte repräsentieren Mittelwerte + Standardabweichung mit der Anzahl der Versuche in Klammern.

n.s. = nicht signifikant ^b_{2p}<0,005 ^c_{2p}<0,001

3.2.7. Pyruvat und Prolin

Wie Laktat so übte auch Pyruvat eine starke Hemmung auf die endogene und Prolin-bedingte Ammoniakbildung aus (Tab.11). Mit beiden Substraten im Ansatz war die Glutamatbildung mehrfach gesteigert. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen erwies sich Pyruvat der glukoneogenetischen Kapazität von Prolin deutlich überlegen (30, 34); die Glukosebildungsrate war im Gegensatz zu Laktat jedoch nicht voll additiv zu der aus Prolin. Im Unterschied zu Laktat und 2-Ketoglutarat ließ sich die Pyruvataufnahme durch Prolin nicht stimulieren. Etwa 14% des aufgenommenen Pyruvats fanden sich in Laktat wieder, wobei die Laktatbildung in Anwesenheit von Prolin noch gering gesteigert war.

Außerdem übte Prolin einen stimulierenden Einfluß auf die Alaninbildung aus, die zwar mit 79 $\mu\text{mol/g Prot.} \times 60 \text{ Min.}$ in der Bilanz nicht ins Gewicht fiel, aber dennoch überraschend hoch erschien, da sich in der Ratteniere nur eine geringe Alanin-Aminotransferase nachweisen läßt (17).

Wie Laktat so ist auch Pyruvat ein effektorische Inhibitor der Prolinoxidase (55, 78). Die allosterische Hemmung der Prolinoxidase durch Pyruvat könnte daher die geringe Ammoniakentwicklung in Anwesenheit beider Substrate erklären.

Im Unterschied zu Laktat wurde dabei aber keine Steigerung der Pyruvataufnahme durch Prolin beobachtet. Ein ähnlicher Befund läßt sich mit Pyruvat und Lysin erheben (30) und wird im allgemeinen auf den unterschiedlichen Glukoneogeneseweg von Laktat und Pyruvat zurückgeführt (23, 30), (Abb.9). Da im Gegensatz zu Laktat keine Transaminierungsreaktionen in die Glukoneogenese aus Pyruvat eingeschaltet sind, läßt wahrscheinlich die

Wechselwirkungen zwischen Dihydroxyaceton und Prolin in isolierten Tubuli von Hungerratten

	endogen	Prolin (5 mM)	Dihydroxy- aceton (5 mM)	Prolin + Dihydroxy- aceton	Prolin- effekt	Dihydroxy- acetoneffekt
Ammoniakbildung	133+2 (4)	189+40 (3)	89+15 (3)	232+62 (3)	+143+50 ^a	+43+27 ^{n.s.}
Glutamatbildung	8+13 (4)	15+14 (4)	-2+5 (4)	31+1 (4)	+32+13 ^b	+16+4 ^d
Glukosebildung	41+3 (4)	145+33 (4)	327+132 (4)	499+129 (4)	+172+41 ^d	+354+96 ^c

Alle Angaben in $\mu\text{mol/g Prot.} \times 60 \text{ Minuten}$

Isolierte Tubuli von Hungerratten wurden über 60 Minuten in Krebs-Henseleit-Medium inkubiert. Zu jedem Versuch wurden die Wirkungen von Prolin und Dihydroxyaceton durch Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle des gleichen Versuchs ermittelt. Alle Werte repräsentieren Mittelwerte + Standardabweichung mit der Anzahl der Versuche in Klammern.

n.s. = nicht signifikant ^a $p < 0,05$ ^b $p < 0,025$ ^c $p < 0,01$ ^d $p < 0,005$

weniger als additiv gesteigerte Glukoneogenese bei stark reduzierter Ammoniakbildung nicht auf eine Stimulierung des Aspartat-Shuttles durch vermehrten Anfall von Glutamat aus Prolin schließen, sondern eher auf eine Hemmung der Pyruvatoxidation durch Prolin.

Wie 2-Ketoglutarat und Oleat so könnte auch Prolin den Anteil aktiver Pyruvat-Dehydrogenase senken und die stimulierende Wirkung von Pyruvat auf das gleiche Enzym aufheben (38, 39). Dies hätte zur Folge, daß mehr Pyruvat carboxyliert und in die Glukoneogenese eingeschleust würde.

Die vermehrte Bildung von Alanin aus Pyruvat durch Prolin deutet wie die Glutaminbildung auf den geraden Teil des proximalen Tubulus als Ort des Prolinstoffwechsels hin, da hier die höchste Aktivität der Alanin-Aminotransferase gefunden wird (17).

3.2.8. Dihydroxyaceton und Prolin

Dihydroxyaceton steigerte die Ammoniakbildung aus Prolin um 23% (Tab.12). Diese Wirkung ließ sich jedoch statistisch nicht absichern. Der Glutamatspiegel war in Gegenwart beider Substrate gegenüber Prolin als Kontrolle verdoppelt. Dihydroxyaceton erwies sich als ausgezeichnetes Substrat der renalen Glukoneogenese. Mit $343 \mu\text{mol/g Prot.} \times 60 \text{ Min.}$ bildete Dihydroxyaceton $2,5 \times$ mehr Glukose als Prolin, wobei die Glukoneogeneserate in Anwesenheit beider Substrate mehr als additiv gesteigert war.

Von allen untersuchten glukogenen Substraten nimmt Dihydroxyaceton eine Sonderstellung ein, da es Glukose bilden kann, ohne ins Mitochondrium eingeschleust zu werden. Tatsächlich gibt der Befund einer additiv gesteigerten Glukosebildung in Zusammenhang mit der durch

Dihydroxyaceton nicht veränderten Ammoniakbildung aus Prolin einen Hinweis, daß der Stoffwechsel und Dihydroxyaceton ohne gegenseitige Beeinflussung verläuft. Die additive Wirkung von Prolin und Dihydroxyaceton auf die Glukosebildung wäre möglicherweise durch eine getrennte intrarenale Lokalisation zu erklären.

3.3. Studien zur Prolinoxidase in der Niere

3.3.1. Meßverfahren für Prolinoxidase

Die Oxidation von L-Prolin durch die Prolinoxidase ergibt Δ_1 -Pyrrolin-5-Carboxylat.

Dieses Produkt kann quantitativ durch eine Reaktion mit o-Aminobenzaldehyd bestimmt werden (52, 87). Dabei entsteht vermutlich ein Dihydroquinazolium-Derivat mit einem Absorptionsmaximum im sichtbaren Bereich. Die Messung setzt ein intaktes Elektronensystem voraus.

In dieser Arbeit kam hauptsächlich eine zweite Meßmethode für Prolinoxidase zur Anwendung. Hierbei wird der durch die Prolinoxidation freigesetzte Wasserstoff auf FAD übertragen und von dort in einer nicht-enzymatischen Reaktion auf Iodonitrotetrazolium-Chlorid weitergegeben, wobei Phenazinmethosulfat als weiterer Zwischenträger fungiert (52, 78). Dem Reaktionsansatz wurde Cyanid zugesetzt, um den Reaktionsfluß durch die Atmungskette zu blockieren und somit eine mögliche Reoxidation der Elektronenakzeptoren zu verhindern.

Mit beiden Testmethoden ließen sich in Gesamthomogenaten der Nierenrinde nahezu die gleichen Enzymaktivitäten für Prolinoxidase nachweisen (Tab.13). Allerdings muß die höhere Reaktionstemperatur von 37°C beim ABA-Test gegenüber 25°C beim INT-Test berücksichtigt werden. Der ABA-Test zeichnete sich jedoch durch eine größere Prä-

Tabelle 13

Vergleich zweier Meßmethoden für Prolinoxidase in Homogenaten der Ratten-
nierenrinde

Meßmethode	Prolinoxidaseaktivität ($\mu\text{mol/g Prot.} \times \text{Minute}$)
------------	--

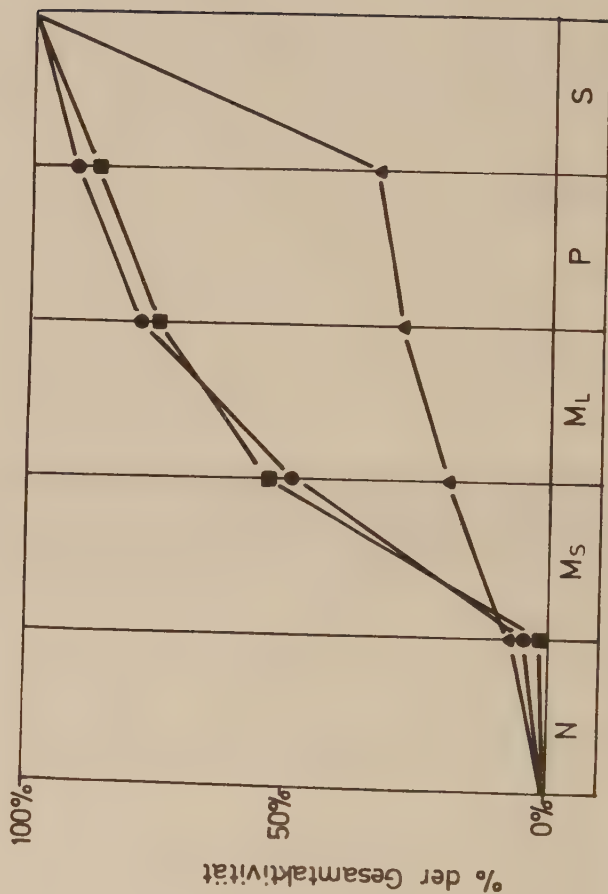
o-Aminobenzaldehyd-Test	2,5 $\pm$ 0,2
-------------------------	---------------

Tetrazolium-Test	2,6 $\pm$ 0,6
------------------	---------------

Drei 150-190 g schweren Ratten wurden in leichter Pentobarbital-Narkose die Nieren entnommen, in Sucrose-Medium (0,25 M, pH 7,5) und das Mark grob entfernt. Die Nierenrinden wurden durch Sonifikation und Pottern homogenisiert. Für weitere methodische Details siehe Text und methodischen Anhang. Die Enzymaktivitäten stellen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von 6 Nieren dar.

Abbildung 10

Intrazelluläres Verteilungsmuster der renalen Prolinoxidase in Abhängigkeit von der Bestimmungsmethode



Für experimentelle Details siehe Text und methodischen Anhang 6.6

■ = ABA-Test, ● = INT-Test, ▲ = Protein

K = Kerne, M_S = schwere Mitochondrien, M_L = leichte Mitochondrien

P = Mikrosomen, S = Überstand

zision aus. Wie aus Abb. 10 hervorgeht, ließen beide Testmethoden bei Anwendung auf durch Differentialzen-trifugation gewonnene Hauptfraktionen eine weitgehend identische subzelluläre Prolinoxidaseverteilung erken-nen. Dies deutet darauf hin, daß beide Meßverfahren das gleiche Enzym messen.

Bei einem Vergleich beider Testmethoden für Prolinoxi-dase zeigte sich der spektrophotometrische INT-Test der chemischen ABA-Methode in der leichten und schnellen Durchführbarkeit der Messung überlegen. Nachteile des INT-Tests lagen jedoch in der ausgesprochenen Licht-empfindlichkeit von Phenazinmethosulfat und dem Tetra-zolium-Salz. Dies machte ein lichtgeschütztes Arbeiten unbedingt erforderlich.

3.3.2. Einfluß von Einfrieren auf die Prolinoxidase-aktivität in Zellfraktionen gepotterter Nie-renrinden

Die Prolinoxidase ist wahrscheinlich wie die Succinat-Dehydrogenase fest an die innere Mitochondrienmembran gebunden (14) und deshalb vermutlich für externe Elek-tronenakzeptoren nur schwer zugänglich. Wir versuchten deshalb in Erfahrung zu bringen, ob durch mehrmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Wiederauftauen im warmen Wasserbad, wodurch die Mitochondrienmembranen aufbrechen, sich eine Aktivitätssteigerung der Prolin-oxidase mit dem Tetrazolium-Test erzielen läßt.

Wie aus Tab. 14 hervorgeht, konnten wir tatsächlich eine leichte Aktivitätssteigerung in einem Nierenrin-denhomogenat und allen Zellfraktionen mit Ausnahme des Überstands beobachten. Die größte Aktivitätszunahme zeigte mit 27% die leichte Mitochondrienfraktion.

Tabelle 14

Einfluß mehrmaligen Einfrierens auf die Prolinoxidaseaktivität in Zellfraktionen von gepotterten Nierenrinden

Versuchsdatum	Zellfraktion	Auflösungsmedium	Testmethode	Prolinoxidaseaktivität ($\mu\text{mol/g}$ Feuchtgewebe x Minute)	
				frisch	nach 3x Einfrieren und Wiederauftauen
29.12.1978	Gesamthomogenat	0,25 M Sucrose pH 7,4	INT-Test	690	760
	Kerne	"	"	300	330
	Mitochondrien schwer	"	"	1150	1210
	Mitochondrien leicht	"	"	460	620
	Mikrosomen	"	"	250	310
	Überstand	"	"	80	80

Die Nieren einer 190 g schweren, gefütterten Ratte wurden in Sucrose-Medium durch Potters homogenisiert. Der weitere Zellaufschluß erfolgte wie in Abschnitt 6.6. beschrieben. Ein Teil der Zellfraktionen wurde kurz vor der Messung in flüssigem Stickstoff 3x rasch eingefroren und jeweils im warmen Wasserbad wiederaufgetaut.

Diese Befunde veranlaßten uns, in den folgenden Versuchen einen "membranaggressiven" Zellaufschluß mit Hilfe von Sonifikation, Pottern und Gefrierschock zu wählen. Dies sollte einen ungehinderten Zugang des Tetrazolium-Salzes zur membrangebundenen Prolinoxidase ermöglichen und so optimale Testbedingungen für Prolinoxidasemessungen gewährleisten.

3.3.3. Lokalisation des Prolinstoffwechsels in der Niere

Prolinoxidaseaktivität ist bereits in verschiedenen Säugernieren einschließlich der des Menschen nachgewiesen worden (87). Diese Untersuchungen machten jedoch keine Angaben, in welchem Nierenabschnitt Prolin verstoffwechselt wird. Die Zuordnung dieses Stoffwechselweges zu einer morphologischen Nierenstruktur ist aber von großer Bedeutung, um unsere Befunde im Zusammenhang mit den anderen Nierenleistungen diskutieren zu können.

Dazu dissezierten wir Nieren von Ratte, Schwein, Rind und Mensch in Rinde, äußeres und inneres Mark und bestimmten in den Homogenaten die Aktivität von Prolinoxidase und zum Vergleich die von Succinat-Dehydrogenase. Die Succinat-Dehydrogenase gilt als weiteres Enzym der inneren Mitochondrienmembran und läßt sich mit besonders hoher Aktivität in den an Mitochondrien reichen, kortikalen und medullären Abschnitten der Henleschen Schleife nachweisen (49).

Bei einem Vergleich der Enzymaktivitäten zwischen den einzelnen Säugernieren ließ sich in der Rattennierenrinde mit 0,690 $\mu\text{mol/g}$ Feuchtgewebe x Min. eine Prolinoxidaseaktivität beobachten, die viermal höher lag als die vom Schwein und Rind und etwa achtmal höher als die vom Menschen (Tab. 15).

Tabelle 15

Vergleich der Enzymaktivitäten von Prolinoxidase und Succinat-Dehydrogenase
in Nierenrinden von mehreren Säugerspezies

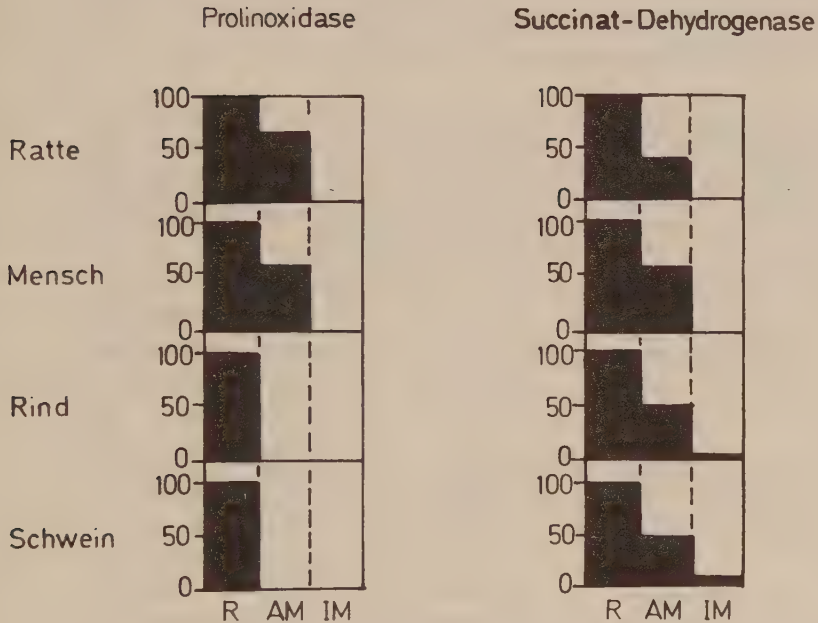
Spezies	Prolinoxidase Aktivität ($\mu\text{mol/g}$ Feuchtgewebe x Minute)	Succinat-Dehydrogenase
---------	---	------------------------

Ratte	0,690	6,300
Mensch	0,085	0,910
Rind	0,145	6,020
Schwein	0,160	5,520

Die Enzymaktivitäten wurden wie in Abschnitt 6.7. beschrieben im Gesamthomogenat der Nierenrinden bestimmt. Die Ergebnisse stellen Einzelmessungen dar.

Abbildung 11

Verteilung der Prolinoxidase und Succinat-Dehydrogenase in verschiedenen Abschnitten von Säugernieren



Die Nieren wurden in Rinde (R), äusseres Mark (AM) und inneres Mark (IM) disseziert und die Gewebstücke wie unter 6.7 beschrieben weiter aufgeschossen. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte mit dem INT-Test. Auf der Ordinate ist die Aktivität pro g Frischgewicht in % der Rindenaktivität angegeben.

Die Succinat-Dehydrogenaseaktivität, die in der Nierenrinde von allen Spezies eine beinahe zehnmal höhere Aktivität zeigte als die Prolinoxidase, war ebenfalls in der Rattennierenrinde am höchsten ($6,3 \mu\text{mol/g}$ Feuchtgewebe $\times \text{Min.}$) und in der menschlichen Nierenrinde am niedrigsten ($0,9 \mu\text{mol/g}$ Feuchtgewebe $\times \text{Min.}$). Abweichend von den Befunden mit Prolinoxidase ist die Succinat-Dehydrogenaseaktivität in der Schweine- und Rinderniere relativ hoch.

Bei Betrachtung der Enzymverteilung in den dissezierten Abschnitten wurde deutlich (Abb.11), daß die Rinde bei allen Spezies eine höhere Aktivität pro g Gewebe aufwies als das Mark. Eine meßbare Prolinoxidaseaktivität im äußeren Mark ließ sich tatsächlich nur bei der Ratte mit 67% der Rindenaktivität und beim Menschen mit 61% nachweisen. Dagegen fand sich in dieser Nierenstruktur bei allen untersuchten Spezies Succinat-Dehydrogenaseaktivität und zwar von 37% der Rindenaktivität bei der Ratte bis zu 62% beim Menschen. Im inneren Mark, das seine Stoffwechselbedürfnisse vorwiegend durch anaerobe Glykolyse befriedigt, waren maximal 5% der Succinat-Dehydrogenaseaktivität der Nierenrinde meßbar.

Die Aussagekraft dieser Ergebnisse erfährt allerdings durch den niedrigeren Proteingehalt des Nierenmarks gegenüber der Nierenrinde eine Einschränkung. Bezöge man sich auf die spezifische Aktivität ($\mu\text{mol/g Prot.} \times \text{Min.}$), so würde man beispielsweise bei der Ratte im äußeren Mark eine um 23% höhere Aktivität finden als in der Rinde.

Die Dissektion der Nieren in Rinde, äußeres und inneres Mark erlaubt keine exakte Zuordnung der Enzymaktivität zu einem bestimmten Nephronabschnitt. Die Tatsache, daß die Nierenrinde bei allen Spezies eine höhere Aktivität aufweist als alle anderen Nierenstrukturen, paßt jedoch gut zu der hohen Glukoneogeneserate aus Prolin, die be-

reits eine Lokalisation des renalen Prolinstoffwechsels im proximalen Tubulus als Ort der renalen Glukoneogenese vermuten ließ.

Auch die Glutaminbildung aus Prolin, die durch die Kenntnis der Lokalisation der Glutamin-Synthetase dem geraden Teil des proximalen Tubulus zuzuordnen ist (16), kann als zusätzlicher Hinweis aufgefaßt werden, daß Prolin in diesem Tubulusabschnitt verstoffwechselt wird.

Die hohe Aktivität der Prolinoxidase und Succinat-Dehydrogenase in der Nierenrinde steht außerdem im Einklang mit Untersuchungen zur mitochondrialen Verteilungsdichte des Nephrons, die im aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife und im proximalen Tubulus am höchsten ist (72). Die Aktivität im äußeren Mark kann sowohl durch den Gehalt dieses Nierenteils an geraden Teilen des proximalen Tubulus als auch durch den hohen Gehalt an aufsteigenden Teilen der Henleschen Schleife erklärbar sein.

Zusammenfassend darf aufgrund unserer Befunde die proximale Lokalisation des Prolinstoffwechsels als erwiesen gelten, während wir aber über den distalen Tubulus noch keine Aussage machen können.

3.3.4. Einfluß von Azidose und Alkalose auf die Aktivität der renalen Prolinoxidase

Zwar ist die Stellung von Glutamin als hauptsächlicher Vorläufer des Harnammoniaks unbestritten, doch sind mit großer Wahrscheinlichkeit noch andere Aminosäuren an der Produktion von Harnammoniak beteiligt (71, 80, 89). So ist z.B. von Versuchen am lebenden Hund und Menschen bekannt, daß die renale Prolinextraktion aus dem Plasma während einer Azidose gesteigert ist (71, 80).

Tabelle 16

Säure-Basenhaushalt von fünf Ratten nach NH_4 - oder NaHCO_3 -Fütterung

Tiere	Stoffwechselfparameter					Stoffwechsel-		Bemer- kungen
						lage		
	Blut					Harn		
	pH	pCO ₂	pO ₂	HCO ₃ ⁻	BE	pH		
AZ ₁	7,2	37,5	107,4	14,7	-12,8	6	Azidose	
AZ ₂	7,22	20,2	124,2	11	-18	?	Azidose	leere Blase
AZ ₃	7,17	29,8	120,9	10,9	-16,5	5,5	Azidose	
AL ₁	7,48	51,4	66,3	38,4	+13,3	7,5	Alkalose	
AL ₂	7,67	38,8	71,9	44,6	+23,4	8	Alkalose	

40 Stunden nach Beginn einer Sondenfütterung mit NH_4 - oder NaHCO_3 - Glukose-
lösungen wurden den Ratten sofort nach Laparotomie in leichter Äthernarko-
se eine arterielle Blutgasprobe aus der Bauchorta zur Überprüfung der Stoff-
wechsellaage entnommen. Die Tiere erhielten keine andere Nahrung. Für weite-
re experimentelle Details siehe Abschnitt 6.8.

AZ = Azidosetiere, AL = Alkalosetiere, BE = base excess

Tabelle 17

Einfluß von Azidose und Alkalose auf die Aktivität der renalen Prolinoxidase

Tiere	Stoffwechsellaage	Prolinoxidaseaktivität ($\mu\text{mol/g Prot.} \times \text{Minute}$)
AZ ₁	Azidose	5,0
AZ ₂	Azidose	4,6
AZ ₃	Azidose	5,0
AL ₁	Alkalose	4,7
AL ₂	Alkalose	5,3

Die Enzymaktivität wurde im Gesamthomogenat nach Aufschluß durch Sonifika-
tion und Pottren mit dem INT-Test bestimmt. Die Angaben stellen Mittelwerte
von zwei Messungen an zwei verschiedenen Tagen dar.

Da eine Änderung der renalen Glutaminaseaktivität als Regulationsmechanismus für die gesteigerte Ammoniakabscheidung während einer metabolischen Azidose diskutiert wird (27, 31), gingen wir der Frage nach, ob die renale Prolinoxidation durch Azidose und Alkalose beeinflusst wird.

Wir führten deshalb über 40 Stunden eine Sondenfütterung mit einer Ammoniumchlorid-Glukoselösung oder Natriumhydrogencarbonat-Glukoselösung an insgesamt fünf Ratten durch. Tab. 16 gibt Aufschluß über die Stoffwechsellaage der Tiere zum Zeitpunkt des Schlachtens. Obwohl drei Tiere (AZ_1 - AZ_3) deutliche Zeichen einer metabolischen Azidose aufwiesen und die beiden anderen Ratten (AL_1 + AL_2) die Blutgaswerte einer metabolischen Alkalose zeigten, ließ sich kein Unterschied in der Prolinoxidaseaktivität in den Homogenaten der Nierenrinde zwischen den azidotischen und alkalotischen Ratten nachweisen (Tab.17).

Der fehlende Anstieg der Prolinoxidaseaktivität zeigt, daß im Gegensatz zur Glutaminase die Prolinoxidase nicht durch den Säure-Basenstatus verändert wird. Dies läßt jedoch nicht auf eine fehlende Regulierbarkeit des Prolinstoffwechsels durch Änderungen im Säure-Basenhaushalt schließen. Es konnte z.B. in isolierten Tubuli der Hühnerniere eine gesteigerte Ammoniakfreisetzung und Glukosebildung aus Prolin nach einer einwöchigen Azidose beobachtet werden (15). So hat eine Bicarbonat- und pH-Änderung *in vitro* einen deutlichen Einfluß auf die NH_4 -Bildung (56, 93) und könnte sekundär über eine Verminderung des Glutamins auch den Prolinstoffwechsel regulieren.

4. Allgemeine Diskussion

4.1. Welche Stellung nimmt Prolin in der Hierarchie der Energiesubstrate der Niere ein?

In dieser Arbeit sind zum ersten Mal systematisch die Wechselbeziehungen zwischen Prolin und anderen Energiesubstraten der Niere dargestellt. Die Ergebnisse unterstreichen die Beobachtungen von vielen Untersuchern, daß der Nierenstoffwechsel weitgehend vom Substratangebot der umgebenden extrazellulären Flüssigkeit reguliert wird (4, 28, 41).

Dabei übersteigt bei Prolin wie bei allen bisher untersuchten Substraten die Aufnahmerate den Energiebedarf, der zur Deckung der renalen Stoffwechselbedürfnisse notwendig ist (22, 38, 74, 96).

Der überwiegende Anteil der im Überschuß aufgenommenen Substrate werden in biosynthetische Stoffwechselwege wie Triglyceridbildung und Glukoneogenese eingeschleust (41, 42). Nur ein Teil des aufgenommenen Substrats wird vollständig oxidiert.

In Übereinstimmung mit anderen Studien konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, daß Substrataufnahmeraten und Produktbildungsraten intrazellulären Wechselbeziehungen und Regulationsmechanismen unterworfen sind (38, 41, 96).

Tab. 18 und 19 fassen die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Energiesubstraten in Bezug auf die Substrataufnahme- und Produktbildungsraten noch einmal zusammen, wobei auch andere Studien mit Nierenrindenschnitten und Tubuluspräparationen berücksichtigt sind. Offensichtlich beeinflußt jedes Substrat die Aufnahme und das Stoffwechselschicksal des anderen. Dabei läßt die Niere Präferenzen für bestimmte Substrate erkennen. In Abb. 12

Tabelle 18

Wechselwirkungen zwischen Energiesubstraten auf die Aufnahmeraten in Nierenrindenpräparationen

Substrat beeinflusst die Aufnahme von:

	Oleat	Glutamin	2-Ketoglu- tarat	Laktat	Pyruvat	Prolin
Oleat	-			↘ (38) (41) (96)	↘ (38)	→ e.U.
Glutamin	↗ (41)	-				
2-Ketoglutarat		↘ (45)	-			
Laktat	↗ (41)	↘ (41)		-		↘ e.U.
Pyruvat		↘ (51)			-	
Prolin		↘ (2) e.U.	↗ e.U.	↗ e.U.	→ e.U.	-

Tabelle 19

Einfluß von energieliefernden Substraten auf die Ammoniakbildung aus Prolin und Glutamin in Nierenrindenpräparationen

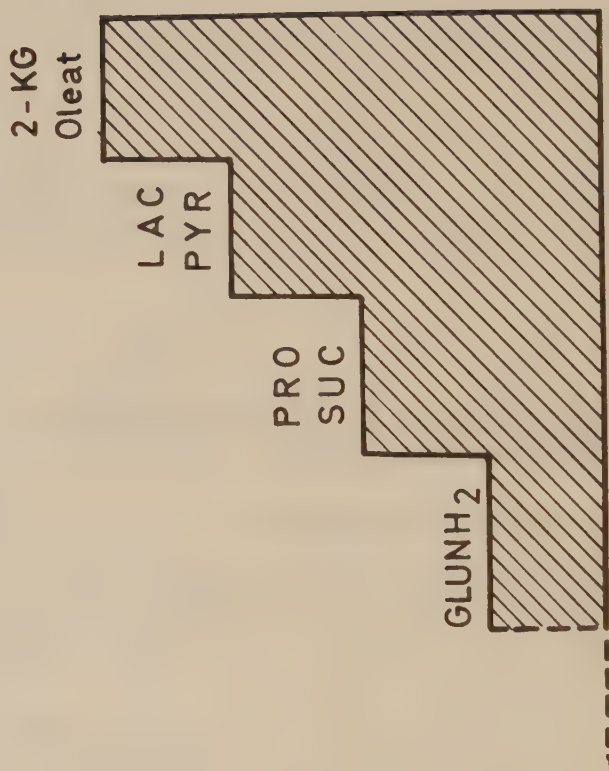
Substrat beeinflusst die Ammoniakbildung aus:

	Prolin	Glutamin
Oleat	→ e.U.	↘ (41)
2-Ketoglutarat	↘ e.U.	↘ (45, 75)
Succinat	→ e.U.	
Laktat	↘ e.U.	↘ (41)
Pyruvat	↘ e.U.	↘ (51)

↗ = Steigerung ↘ = Hemmung → = keine Beeinflussung
e.U. = eigene Untersuchung

Abbildung 12

Hypothetische Hierarchie der Energiesubstrate des Niereninstoffwechsels



versuchten wir - gestützt auf die Daten der Literatur - eine hypothetische Substrathierarchie des Nierenstoffwechsels darzustellen, wobei diese Stufung von Energiesubstraten aufgrund der Unvollständigkeit der Befunde und der zum Teil unterschiedlichen experimentellen Bedingungen nur vorläufigen Charakter haben kann.

2-Ketoglutarat und Oleat würden auf einer solchen Substrattreppe höher stehen als Laktat und Pyruvat, da sie über die Hemmung der Pyruvat-Dehydrogenase die Oxidation dieser Substrate hemmen (39). Prolin nähme mit Succinat eine mittlere Stellung ein. Zumindest die Prolinaufnahme und der Prolinverbrauch wird durch Laktat gehemmt. Trotz der unbestrittenen Bedeutung von Glutamin als Vorläufer des Harnammoniaks scheint die Niere Prolin als energielieferndes Substrat Glutamin vorzuziehen, da alle aufgeführten Substrate die Glutaminaufnahme und Ammoniakbildung aus Glutamin hemmen (41, 45, 51).

Versucht man z.B. das Verhalten der verschiedenen Substrate über einen gemeinsamen Wirkungsmechanismus zu erklären, so fällt auf, daß alle Substrate, die mit hoher Priorität aufgenommen werden (Oleat, Succinat, Prolin), im Stoffwechselweg ihrer mitochondrialen Oxidation FADH_2 bilden. Damit ergibt sich eine mögliche regulatorische Funktion der Atmungskette auf der Ebene der Wasserstoff übertragenden Cofermente: Eine Reduktion der Flavinnukleotide führt zu einer bevorzugten Veratmung dieser Wasserstoffspezies mit einer Hemmung der Oxidation der Pyridinnukleotide. Die Reduktion des NAD hat wahrscheinlich zur Folge, daß die mitochondriale Oxidation aller NAD-abhängigen Substrate gehemmt wird (Pyruvat, 2-Ketoglutarat, Glutamin).

Die Regulation des Substratstoffwechsels auf der Ebene des mitochondrialen Energiezustands wird offensichtlich durch direkte Wechselwirkungen von Substraten auf Enzyme

durchbrochen (z.B. Hemmung der Prolinoxidase durch Laktat und Pyruvat oder Hemmung der Glutaminase durch Glutamat (55, 77, 78)).

Zusätzlich weisen einige Untersuchungen auf eine Wechselwirkung auf der Ebene des zellulären und mitochondrialen Transports hin (z.B. Hemmung des mitochondrialen Glutamintransports durch 2-Ketoglutarat (32) oder Hemmung des Glutamintransports durch Prolin (2)).

4.2. Welche Beziehungen bestehen zwischen dem renalen Prolintransport und dem Prolinstoffwechsel?

Mikropunktions- und Mikroperfusionsstudien konnten ein spezifisches und ein unspezifisches Transportsystem für L-Prolin am Bürstensaum des proximalen Tubulus nachweisen (8, 94). Obwohl auch unsere Tubulusversuche und die Messung von Prolinoxidaseaktivität in den Schichten der Niere den Prolinstoffwechsel einen Platz im proximalen Tubulus zuweisen, kann nur die direkte Bestimmung von Prolinstoffwechselaktivität in definierten mikrodissezierten Nephronabschnitten Klarheit über die renale Lokalisation dieses Stoffwechselweges verschaffen.

So konnten Untersuchungen zur intrarenalen Lokalisation des Glukosestoffwechsels zeigen, daß Resorptionsort und Stoffwechselort nicht identisch sein müssen. Glukose wird nahezu vollständig im proximalen gewundenen Tubulus resorbiert. Die Stoffwechselwege sind hier jedoch am geringsten. Die distalen Nephronabschnitte haben im Gegensatz dazu eine hohe Stoffwechselkapazität für Glukose, hier wird jedoch Glukose nicht aus dem tubulären Lumen resorbiert (21, 36). Die Resorption kann also völlig unabhängig von einer möglichen Verstoffwechselung ablaufen. Sonst könnten z.B. nicht-verstoffwechselbare Aminosäureanaloga nicht im proximalen Tubulus resorbiert werden (94).

Prolin stellt hier eher eine Ausnahme dar, da es sowohl im proximalen Tubulus resorbiert als auch verstoffwechselt wird. Dieser Zusammenhang gilt sonst nur noch für Glutamin und Glutamat (81). Silbernagl konnte zeigen, daß Gabe von 2-Ketoglutarat, das den Glutaminstoffwechsel stark hemmt, keinen Einfluß auf den tubulären Transport von Glutamin hat (81).

Ein nicht quantifizierbarer Teil der Aminosäuren kann peritubulär transportiert werden (82, 83). Dieser Transport könnte eher mit der Stoffwechselrate korrelieren, da er sich parallel zu ihr ändert (63).

So scheint die tubuläre Rückresorption der Aminosäure zwar an den Stoffwechsel von Prolin gekoppelt zu sein, dieser ist jedoch nicht der Mechanismus der Resorption, sondern übt hauptsächlich eine unterstützende Funktion aus.

In diesem Zusammenhang gibt auch die Klinik des Prolin-stoffwechsels einen wichtigen Hinweis auf mögliche Beziehungen zwischen Prolinrückresorption und Prolinmetabolismus. Patienten mit einer Störung des Prolinabbaus durch enzymatischen Defekt der Prolinoxidase (Hyperprolinämie Typ I) oder der Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase (Hyperprolinämie Typ II) zeigen außer einem nur mäßig erhöhten Plasmaprolinspiegel eine vermehrte Prolinausscheidung im Harn (29, 91).

4.3. Physiologische Betrachtungen und Ausblick

Alle in vitro-Modelle sind mit dem Nachteil behaftet, daß die Niere nicht während ihrer physiologischen Funktion der Bildung von Sekundärharn untersucht wird. Der besondere Nachteil unseres experimentellen Modells mit isolierten Tubuli ergibt sich aus der Tatsache, daß das tubuläre Lumen geschlossen sein kann und deshalb möglicherweise Substanzen von der "falschen" peritubulären

Seite in die Zelle eintreten mit der Folge, daß niedrigere Aufnahme­raten beobachtet werden als am Ganztier (34, 42).

Folgende Befunde weisen jedoch auf eine mögliche Bedeutung unserer Versuche auch für die physiologische Situation hin:

- a) Die Glukoneogeneseraten, die in dieser und früheren Studien mit isolierten Tubuli erzielt worden sind, sind mit denen an der Niere in vivo vergleichbar (30, 38, 70, 84).
- b) Substratwechselwirkungen lassen sich am ausgeprägtesten im physiologischen Bereich nachweisen (41). Dieser Befund stützt die Vorstellung, daß Veränderungen der Substratkonzentrationen im arteriellen Blut im allgemeinen das wirkungsvollste Prinzip der Regulation der renalen Substrataufnahme sind (22, 41).
- c) Bei Patienten mit Laktatazidose oder angeborenem Mangel an Pyruvat-Dehydrogenase und 2-Ketoglutarat-Dehydrogenase wird neben einem erhöhten Plasmaalaninspiegel auch eine Hyperprolinämie beobachtet (44, 65). Diese Fallstudien lassen vermuten, daß die an der Ratte gefundene effektorische Hemmung des Prolinstoffwechsels durch Laktat auch für den Menschen gültig ist.

Daß sich jedoch eine generelle Übertragung der an der Ratte gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit auf eine andere Tierspezies und auf den Menschen zunächst verbietet, zeigen beispielsweise die spezie­eigenen Unterschiede in der Prolinoxidaseaktivität der Niere. Deshalb wird es Aufgabe zukünftiger Arbeiten sein, die Wechselbeziehungen und damit im Zusammenhang stehenden Regulationsmechanismen zwischen Prolin und anderen Energiesubstraten beim Menschen zu überprüfen. Schließlich werden die in den letzten Jahren entwickelten Mikrodissektionstechniken zusammen mit neueren hochempfindlichen Enzymassays es voraussichtlich erlauben, dem renalen Prolinstoffwechsel einen gesicherten Platz auf der "Enzymkarte" der Niere zuzuweisen.

5. Materialien

5.1. Geräte

5.1.1. Zentrifugen

Ultrazentrifuge "Spinco" L2 65B, Beckman Instruments, München

Standardzentrifuge Typ UJ 1, Fa. Christ, Osterode/Harz

Tischzentrifuge 3200, Eppendorf-Gerätebau, Hamburg

5.1.2. Homogenisatoren

Potter-Elvehjem Typ mit Teflon-Stempel

Motor Typ RW 38, Janke & Kunkel KG, Staufen i. Brsg.

Motor Typ 328, Fa. Krups, Solingen

Ultra-Turrax Typ TP18/12N, Janke & Kunkel KG, Staufen i. Brsg.

5.1.3. Photometer

Typ 1101 M, Fa. Eppendorf-Gerätebau, Hamburg

Typ P4, Fa. Zeiss, Oberkochen/Württ.

5.1.4. Schüttelwasserbäder

Typ RW 650, Fa. New Brunswick, New Brunswick N.J., U.S.A.

Typ 3047, Fa. Kottermann, Hünningen

5.2. Chemikalien

o-Aminobenzaldehyd (Sigma), Aminoxyacetat - HCl (K+K Lab.),
Bernsteinsäure-Na₂-Salz (Serva), Collagenase Typ CLS II
(Worthington Freehold), Dihydroxyaceton (Roth), L-Glutamin
(Sigma), Glutaminase Grade II (Sigma), Iodonitrotetrazolium-Chlorid (Serva), alpha-Ketoglutarsäure (Boehringer-Mannheim), L-Milchsäure-Na-Salz (Serva), Ölsäure (Serva),
Na-Pentobarbital (Deutsche Abbott), Phenazinmethosulfat
(Roth), L-Prolin (Serva), Pyruvat-Na-Salz (Boehringer-Mannheim)

Rinderalbumin, Fraktion V (Serva).

Alle anderen Enzyme und Coenzyme wurden von Boehringer-Mannheim und alle übrigen Chemikalien von Merck, Darmstadt bezogen.

5.3. Versuchstiere

Für alle Versuche verwendeten wir männliche 150-250 g schwere Sprague-Dawley Ratten (E. Jantz, D 7964 Kisslegg).

5.4. Standarddiät

Als Standarddiät wurde Labortierfutter Herilan R/M 204 (H.Eggersmann, D 3260 Rinteln) verwendet.

6. Methoden

6.1. Inkubationsmedium

Als Standardpuffer zur Tubuluspräparation diente der Krebs-Henseleit-Puffer (58). Er wurde wie folgt zubereitet:

100 Teile	0,9%	NaCl
4 Teile	1,15%	KCl
3 Teile	1,67%	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
1 Teil	3,82%	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
1 Teil	2,11%	KH ₂ PO ₄
21 Teile	1,3%	NaHCO ₃

Dieses Gemisch wurde 15 Minuten mit Carbogen begast und mit 1,3% Natriumhydrogencarbonat auf pH 7,4 eingestellt.

6.2. Herstellung isolierter Nierenrindentubuli

Isolierte Nierenrindentubuli wurden nach der von Guder et al. (34,37,40) beschriebenen Methode hergestellt.

In leichter Pentobarbital-Narkose wurden die Nieren in situ mit kaltem Krebs-Henseleit-Puffer durchspült und blutfrei entnommen. Die Nieren wurden dekapuliert, halbiert und das Mark grob herausgeschnitten. Die so gewonnenen Nierenrinden wurden mit Hilfe eines Pistills, der mit Parafilm überzogen war, durch ein Plastiksieb gepreßt. Die Organpartikel wurden von der Unterseite abgekratzt und in ca. 20 ml Puffer aufgenommen. Dabei erhielt man in etwa 5 g Gewebsbrei von fünf Ratten für einen Versuch. Um die Gewebsteile von zerstörten Partikeln und Gewebssaft zu befreien, wurde der Überstand mehrmals dekantiert und erneut mit Puffer aufgefüllt. Der gewaschene Gewebsbrei wurde mit roher Collagenase in Plastikgefäße gefüllt. Eine Flasche enthielt dabei 2,5 g Gewebe in 25 ml Inkubationsmedium mit 0,75 mg/ml Collagenase. Die Flaschen wurden 30 Sekunden mit Carbogen begast, verschlossen und anschließend 30 Minuten in einem Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe einer gleichen Menge kalten Mediums wurde der proteolytische Vorgang gestoppt. Nachdem die groben Gewebspartikel sedimentiert waren (nach ca. 20 Sekunden), wurde der Überstand, der den größten Teil der Tubuli, Zellen und Zelldetritus enthielt, abgegossen. Die Tubuli wurden jetzt durch dreimalige Zentrifugation bei etwa 10 g für 30 Sekunden und jeweils sich anschließendem Waschen von den Zelltrümmern, subzellulären Partikeln und der proteolytischen Wirkung der Collagenase getrennt. Die so erhaltene Tubulussuspension wurde in etwa dem 1,5-2-fachen Volumen des ursprünglichen Gewebsgewichts aufgenommen. Die Proteinkonzentration der Suspension betrug zwischen 11 und 28 mg/ml.

6.3. Aminosäureanalyse eines Tubulusversuchs

2,8 mg Tubulusprotein von Nierenrinden aus Hungerratten wurden mit den neutralisierten Substratlösungen und Krebs-Henseleit-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 1 ml

zusammenpipettiert. Die Proben wurden begast, bei 37°C im Wasserbad inkubiert und die Reaktion durch Überführen der Proben auf Eis gestoppt. Die Ansätze wurden in kalte Eppendorf-Cups umgegossen und kurz zentrifugiert.

Proben mit ungerader Zahl: 500 µl der Proben mit ungerader Zahl wurden mit 0,5 ml Enteiweißungslösung (1 g Sulfosalicylsäure in 18 ml Beckman^R Verdünnungspuffer pH 2 und 2 ml 1 mM Thienylamin) versetzt, kalt gestellt und nochmals 30 Sekunden zentrifugiert. In diesen Proben wurde der Aminosäureverbrauch mit Hilfe eines Aminosäureanalysers gemessen. In den restlichen nicht-ent-eiweißten Überständen wurden außerdem Glutamin und Ammoniak enzymatisch bestimmt.

Proben mit gerader Zahl: 500 µl der Proben mit gerader Zahl wurden mit 50 µl 30% Perchlorsäure enteiweißt und darin Glukose, Laktat, Glutamat und 2-Ketoglutarat bestimmt.

Sediment: Im Sediment einzelner Proben wurden Triglyceride gemessen.

6.4. Herstellung einer Oleatlösung

Oleat wurde an Fettsäure-freies Albumin nach einer Methode von Guder und Wieland (38) gebunden.

Zu 282 mg erhitzter Ölsäure-Roth wurden 1 ml 1N NaOH gegeben und anschließend mit Calcium- und Natriumhydrogencarbonat-freien Krebs-Henseleit-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Diese 20 mM Oleatlösung wurde mit 20% Albuminlösung 1:1 verdünnt.

6.5. Albumin-Reinigung

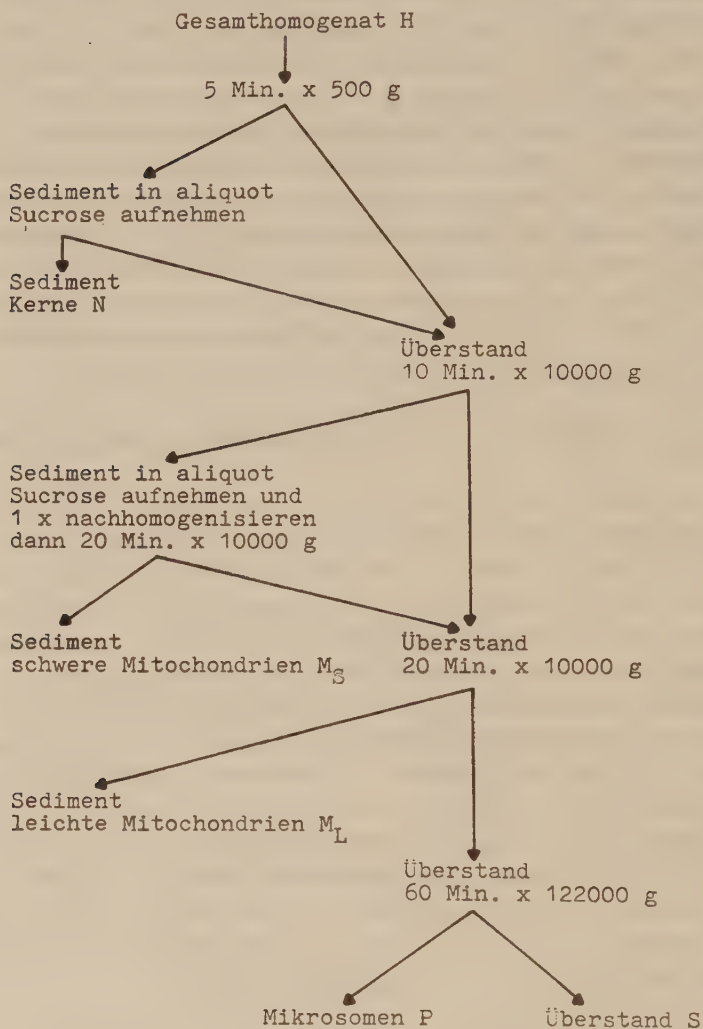
Zur Herstellung von Fettsäure-freien Albumin wurde nach der Methode von Chen (18) vorgegangen.

5 g Albumin wurden in 50 ml H₂O gelöst und mit 7,5 g feuchter Norit-A-Kohle verrührt. Diese Suspension wurde mit 1 N HCl auf pH 3,0 eingestellt, 30 Minuten im Wasserbad stehengelassen und anschließend in der Ultrazentrifuge 2-3 x bei 17000 Upm jeweils 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde durch ein Papierfilter gegeben und mit 1 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Durch ein Millipore-Filter mit Porengröße 0,45 µm wurde die Albuminsuspension von den restlichen Kohlepartikeln befreit. Am Vortag der Versuche wurde der klare Fettsäure-Albumin-Komplex gegen ein 500-faches Volumen Ca-freien und Bicarbonat-freien Salzes bei pH 7,4 für 10-12 Stunden dialysiert. Um eine 20% Lösung zu erhalten, wurde das gefriergetrocknete Albumin mit der fünffachen Menge des Trockengewichts in isotonischer Kochsalzlösung gelöst.

6.6. Herstellung von Nierenhomogenaten und Zellfraktionen

In leichter Pentobarbital- oder Äthernarkose wurden die Nieren in situ mit kaltem, isotonischem Sucrose-Medium (0,25 M, pH 7,4) durchspült und blutfrei entnommen. Die Nieren wurden dekapsuliert, halbiert und das Mark grob herausgeschnitten. Anschließend wurden die Nierenstücke gewogen und im Volumenverhältnis 1:9 in Pufferlösung aufgenommen. Die Gewebesteile wurden durch Sonifikation im Ultra-Turrax (3 x 15 Sek. mit jeweils 30 Sek. Pause bei Stufe 5) und/oder Pottern in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator aus Teflon (10 x Auf- und Abführen bei Stufe 7) aufgeschlossen. Danach wurden die Proben mehrmals in flüssigem Stickstoff kurz eingefroren und jeweils in einem warmen Wasserbad wiederaufgetaut. Die Proben wurden bei - 35°C eingefroren, und die Enzymaktivitäten während der nächsten Tage bestimmt.

Wurde ein weiterer Zellaufschluß durchgeführt, so wurde nach folgendem Schema in Anlehnung an eine Methode von Baudhuin et al. (5) vorgegangen:



6.7. Dissektion verschiedener Säugernieren in Rinde und Markanteile

Aufschluß einer Schweine- und Rinderniere (11.2.1979)

Die Schweine- und Rinderniere waren ein Geschenk des Schlachthofs München. Bei der Schweineniere verstrichen etwa 20 Minuten, bei der Rinderniere 90 Minuten nach dem Schlachten, bevor die Organe auf Eis kühlgehalten werden konnten. Die Nieren wurden im Institut dekapsuliert, in Rinde, äußeres und inneres Mark getrennt und anschließend in isotonem Sucrose-Medium bei pH 7,4 durch Ultra-Turrax-Behandlung und Pottern homogenisiert.

Aufschluß einer menschlichen Niere (28.2.1979)

Die menschliche Niere wurde einer Patientin mit einem hypernephroiden Nierenkarzinom entnommen. Nach der Resektion wurden die gesunden Nierenanteile sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Im Anschluß an die Nierendissektion wurden die tiefgefrorenen Gewebsteile in einer vorgekühlten Emailleschale zu Pulver zerrieben. Der weitere Aufschluß erfolgte in einem Tram-Sucrose-Medium (20 mM/O,25 M, pH 7,4) durch Ultra-Turrax-Behandlung.

Aufschluß einer Rattenniere (11.2.1979)

Die Nieren einer 160 g schweren, gefütterten Ratte wurden in Rinde und Markanteile getrennt, die Gewebstücke in isotoner Sucroselösung (pH 7,4) aufgenommen und durch Pottern homogenisiert.

Prolinoxidase und Succinat-Dehydrogenase wurden entweder am gleichen Tag (menschliche Niere) oder zwei bis vier Tage später (alle anderen Nieren) gemessen.

6.8. Herstellung einer azidotischen und alkalotischen Stoffwechsellage bei Hungerratten

Acht 170-180 g schwere Ratten wurden in zwei Gruppen von jeweils vier Tieren eingeteilt.

Herstellung einer Alkalose:

Mit Natriumbicarbonat angereichertem Trinkwasser und mit einer Natriumbicarbonat-Glukose-Lösung, die 2x täglich per Schlundsonde den Tieren zwangsweise zugeführt wurde, wurde ein alkalotisches Kollektiv geschaffen.

Herstellung einer Azidose:

In gleicher Weise wurde durch das Angebot von mit Ammoniumchlorid azidifiziertem Trinkwasser und durch Zwangsfütterung einer Ammoniumchlorid-Glukose-Lösung eine azidotische Stoffwechsellage bei einem zweiten Kollektiv geschaffen.

Die Tiere erhielten während der ganzen Versuchsdauer keine andere Nahrung. Bei der technisch schwierigen Sondenfütterung verstarben im Versuchsverlauf zwei der Alkalose-Ratten und ein Azidose-Tier.

40 Stunden nach Versuchsbeginn wurden die Tiere in leichter Äthernarkose laparotomiert. Zur Überprüfung der Stoffwechsellage wurde sofort eine arterielle Blutgasprobe aus der Bauchorta entnommen. Außerdem wurde der pH des Blasenharns mit Uristix-Teststreifen bestimmt.

Die Nieren wurden blutfrei entnommen und durch Sonifikation und Pottern in eiskaltem Sucrose-Medium (0,25 M, pH 7,4) weiter aufgeschlossen.

6.9. Inkubationsbedingungen bei Stoffwechselversuchen

Die Tubuli wurden mit Krebs-Henseleit-Medium und neutralisierten Lösungen und anderen Zusätzen in den beschriebenen Konzentrationen zu einem Gesamtvolumen von 1 ml zusammenpipettiert. Zur Inkubation wurden 15 ml Polyäthylen-Plastikgefäße verwendet. Das Inkubationsgemisch wurde auf Eis für 30 Sekunden mit Carbogen begast, schnell verschlossen und in einem schüttelnden Wasserbad (ca. 60 Zyklen pro Minute) bei 37°C inkubiert. Die Inkubation wurde durch Überführen auf Eis gestoppt. Mit 0,1 ml 30% Perchlorsäure wurden die Proben enteiweißt, und die Überstände mit festem Kaliumhydrogencarbonat neutralisiert. Nach vierminütiger Zentrifugation bei 10.000 g in der Eppendorf-Tischzentrifuge wurden in den klaren Überständen mit Hilfe enzymatischer und nicht-enzymatischer Methoden die Stoffwechselmetabolite bestimmt.

Die Glutaminbestimmung wurde in den nicht-enteiweißten Überständen am gleichen Tag ausgeführt.

6.10. Analytische Methoden

6.10.1. Proteinbestimmung

Die Eiweißbestimmung wurde mit einer Biuret-Methode nach einer Vorschrift von Weiss (97) durchgeführt.

Zweimal 50 µl Medium wurden in Eppendorf-Cups pipettiert und zur Eiweißfällung wurde 1 ml Dioxan hinzugegeben. Nach ca. fünf Minuten Rütteln auf dem Eppendorf-Tischrüttler wurden die Proben vier Minuten lang bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Um das Protein quantitativ auszufällen, wurde zum Niederschlag eine 0,3 M Trichloressigsäure-Lösung gegeben, eine Minute gerüttelt, kurz zentrifugiert und wieder abgekippt.

Diesem Sediment wurde 1 ml Biuret-Reagenz (45 g K-Na-Tartrat p.a., 15 g Kupfersulfat, 40 ml 0,2 N NaOH, 25 g Kaliumjodid und Aq. dest. ad 5.000 ml) zugesetzt und solange gerüttelt, bis sich der Niederschlag vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde die Extinktion bei 546 nm gegen H_2O am Photometer abgelesen. Als O-Werte wurde 1 ml Biuret-Reagenz genommen, als Standard diente eine verdünnte Labtrol-Lösung, die wie das Medium behandelt wurde.

6.10.2. Substrat- und Metabolitbestimmungen

L-Alanin (98), Ammoniak (26), L-Glutamat (11), Glukose (10), L-Glutamin (64), L-Laktat (43), 2-Ketoglutarat (9) und Pyruvat (25) wurden mit enzymatischen Standardmethoden bestimmt.

Triglyceride wurden im nicht-enteiweißten Tubulussediment mittels eines vollenzymatischen Tests nach einer Methode von Guder und Wirthensohn (41) bestimmt.

6.10.3. Bestimmung der Prolinoxidase

6.10.3.1. Messung der Prolinoxidase mit o-Aminobenzaldehyd

Die Bestimmung der Prolinoxidaseaktivität mit o-Aminobenzaldehyd erfolgte modifiziert nach einer Methode von Strecker (87).

Prinzip: $L\text{-Prolin} + 1/2 O_2 \longrightarrow P5C + H_2O$

L-Prolin wird durch die Prolinoxidase zu Pyrrolin-5-Carboxylat oxidiert. Dieses Produkt kann durch eine Reaktion mit o-Aminobenzaldehyd bestimmt werden. Dabei entsteht vermutlich ein Dihydroquinazolium-Derivat mit einer Absorption, die im sichtbaren Bereich liegt und die der Konzentration des Produkts proportional ist. Cytochrom c wird dem Ansatz zugesetzt, um unter allen experimentellen Bedingungen eine maximale Aktivität zu gewährleisten.

Pipettierschema:

Konz.d.Stamm- lösung	Bestandteil	Gemisch	µl im Test	Endkonz. im Test
1. 0,2 M	Phosphat- Puffer pH7,5	3 ml		30 mM
2. 0,3 M	L-Prolin	1 ml		15 mM
3. 0,6 mM	Cytochrom c	1 ml		30 µM
		5 ml	50	
4.	H ₂ O		100	
5.	Probe		50	

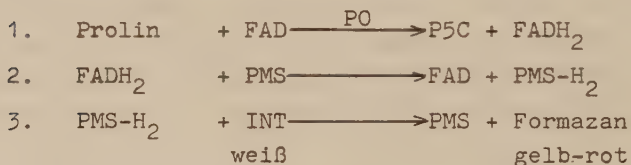
Die Ansätze wurden in Eppendorf-Cups pipettiert, 15 Sekunden mit Carbogen begast und bei 37°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2 ml 0,5% o-Aminobenzaldehyd in 5% Trichloressigsäure gestoppt, und die Proben für weitere 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen. Durch 30 Sekunden Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge wurde der Überstand mit Dihydroquinazolium-Derivat vom Sediment getrennt. 0,2 ml wurden sorgfältig abpipettiert und mit 0,3 ml 5% Trichloressigsäure aufgefüllt.

Eine Leerinkubation ohne Prolin wurde in gleicher Weise behandelt. Die Absorption wurde bei 443 nm in 1 ml Eppendorf-Absaugküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm am Zeiss-Spektralphotometer P4 bestimmt. Zur Kalkulation des P5C-Gehalts wurde der millimolare Extinktionskoeffizient von 2,71 verwendet.

6.10.3.2. Messung der Prolinoxidase mit einem Tetrazoliumsalz

Hierbei wurde in Anlehnung an eine Methode von Johnson & Strecker (52) und Scarpulla & Soffer (78) vorgegangen.

Prinzip: Der bei der Oxidation von Pyrrolin-5-Carboxylat entstehende Wasserstoff wird auf ein Flavin-nukleotid übertragen und von dort in nicht-enzymatischer Reaktion auf p-Iodonitrotetrazoliumchlorid weitergegeben, wobei Phenazinmethosulfat als weiterer Zwischenträger fungiert. Cyanid blockiert dabei wahrscheinlich den Elektronenfluß durch die Atmungskette, die Reoxidation der Elektronenakzeptoren oder auch beides.



Pipettierschema:

Das Reaktionsgemisch für die Enzymmessung wurde wie unten angegeben zusammengemischt. Die Messungen wurden bei 25°C ausgeführt. Die Enzymaktivität wurde in 1 ml-Küvetten mit einer Schichtdicke von 1cm als Absorptionsanstieg bei 546 nm gemessen und mit einem identischen Ansatz ohne Prolin verglichen. PMS und INT sind lichtempfindlich und wurden auch während der Reaktion vor intensiver Lichteinstrahlung geschützt. Der Reaktionsablauf wurde für mindestens fünf Minuten am Photometer verfolgt. Die Enzymmessung war für eine Extinktionszunahme von mehr als 1,5 linear.

Konz.d.Stamm- lösung	Bestandteil	µl im Test	Endkonz. im Test
1. 100 mM	Tris-Puffer pH 7,5	250	48 mM
2. 100 mM	KCN	50	9,5 mM
3. 0,1 mM	FAD	50	0,01 mM
4. 0,2 mM	INT	50	0,02 mM
Start 1	Probe	25	
5. 2 mM	PMS etwa 3 cm vorlaufen lassen	50	0,2 mM
Start 2			
1 mM	Prolin	50	95 mM

Der Extinktionskoeffizient unseres Tetrazoliumssalzes wurde dabei nach einem Vorschlag von Möllering et aliteri (69) durch den Einsatz einer bekannten NADH-Menge in den Test aus dem Lambert-Beer-Gesetz ermittelt. Der Mittelwert aus vier Messungen ergab einen Extinktionskoeffizienten für unsere INT-Charge von $12,8 \text{ mMol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ bei 548 nm.

6.11. Bestimmung der Succinat-Dehydrogenase mit einem Tetrazoliumsalz

Die Enzymaktivität der Succinat-Dehydrogenase wurde in Modifikation einer Methode von Arrigoni & Singer (3) mit Phenazinmethosulfat und Iodonitrotetrazolium-Chlorid als Elektronenakzeptoren bestimmt.

Prinzip: Succinat + FAD $\xrightarrow{\text{SDH}}$ Fumarat + FADH_2

Die Übertragung des Wasserstoffs auf die künstlichen Elektronenakzeptoren erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie es bereits für die Bestimmung der Prolinoxidase mit Tetrazoliumsalz beschrieben wurde.

Pipettierschema:

Meßstrahlung 548 nm; Reaktionstemperatur 25°C

Die Messung erfolgte gegen einen Leerwert ohne Succinat.

Konz. d. Stamm- lösung	Bestandteil	µl im Test	Endkonz. im Test
1. 20 mM	Kalium-Phos- phat-Puffer pH 7,0	250	11,8 mM
2. 4 mM	INT	50	0,30 mM
3. 20 mM	KCN	50	1,9 mM
Start 1	Probe	10	
4. 2 mM	FMS etwa 3 cm vorlaufen lassen	50	0,2 mM
5. 400 mM	Succinat	50	39 mM

6.12. Auswertung und statistische Analyse

Die Stoffwechselraten wurden aus der Differenz von nicht-inkubierten zu inkubierten Tubuli berechnet. Die Bildungsraten wurden in µmol/g Prot. x 60 Minuten ausgedrückt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem gepaarten t-Test von Student berechnet, wenn die Kontrolle in demselben Testansatz mitlief. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung mit der Anzahl der Experimente in Klammern angegeben.

7. Zusammenfassung

Um mehr über das Schicksal von Prolin in der Niere zu erfahren und seine Stellung im Substratstoffwechsel der Niere besser zu verstehen, wurden Stoffwechseluntersuchungen mit Prolin und anderen Energiesubstraten an Collagenase-behandelten Tubuluspräparationen der Rattenniere durchgeführt. Außerdem wurden Messungen von Prolinoxidase in Nierenhomogenaten und Mitochondrienpräparationen vorgenommen, um Aufschluß über die Lokalisation und Regulation des renalen Prolinstoffwechsels zu erhalten.

- a) Dabei zeigte sich, daß Glukose und Ammoniak vor Glutamin, Serin und Alanin die Hauptprodukte des renalen Prolinstoffwechsels der Nierenrinde waren. Glutamat war im Unterschied zu Befunden an der Leber kein wichtiger Metabolit. Nur maximal 35% des aufgenommenen Prolinkohlenstoffs wurden wahrscheinlich vollständig oxidiert.
- b) Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen Prolin und anderen Energiesubstraten der Niere führten zu folgenden Befunden:
 - 1. Oleat hemmte die Glukoneogenese aus Prolin, welches wiederum die Triglyceridsynthese aus Oleat steigerte.
 - 2. Laktat, Pyruvat und 2-Ketoglutarat inhibierten die Ammoniakbildung aus Prolin, während Succinat und Dihydroxyaceton keine Wirkung auf den Stickstoffwechsel von Prolin auszuüben schienen.
 - 3. Prolin steigerte die Aufnahme von Laktat und 2-Ketoglutarat, zeigte keinen Einfluß auf den Pyruvatverbrauch und hemmte die Glutamin-aufnahme.

Es wird gefolgert, daß unter Sättigungsbedingungen Oleat, 2-Ketoglutarat, Laktat und Pyruvat in der Hierarchie der renalen Energiesubstrate Prolin vorgezogen werden. Prolin scheint mit Succinat gleichgestellt zu sein und gegenüber Glutamin sogar von der Niere als Energiesubstrat bevorzugt zu werden.

- c) Bei Schwein, Rind, Ratte und Mensch fand sich die höchste Prolinoxidaseaktivität in der Nierenrinde. Im äußeren Mark ließ sich nur bei der Ratte und beim Menschen diese Enzymaktivität nachweisen. Das innere Mark verstoffwechselte Prolin nicht.

Es wird gefolgert, daß Prolin im proximalen Tubulus verstoffwechselt wird.

- d) Veränderungen im Säure-Basenhaushalt durch Natriumchlorid- oder Natriumhydrogencarbonat-Fütterung hatten keinen Einfluß auf die Prolinoxidaseaktivität.

Literaturverzeichnis

1. ADAMS, E. and L. FRANK
Metabolism of proline and the hydroxy-
prolines
Ann. Rev. Biochem. 49, 1005-61 (1980)
2. ALLEYNE, G.A.O., N.M. ANDERSON and B. SCOTT
Glutamine uptake by cortical slices and
luminal brush border vesicles of rat
kidney
Int. J. Biochem. 12, 99-102 (1980)
3. ARRIGONI, O. and T.P. SINGER
Limitations of the phenazine methosulfate
assay for succinic and related dehydroge-
nases
Nature 193, 1256-58 (1962)
4. BARAC-NIETO, M. and J.J. COHEN
Non-esterified fatty acid uptake by dog
kidney: effects of probenid and chloro-
thiazide
Am. J. Physiol. 215, 98-107 (1968)
5. BAUDHUIN, P., H. BEAUFAY, Y. RAHMAN-LI, O.Z. SELLINGER,
R. WATTIAUX, P. JACQUES and C. DE DUVE
Tissue fractionation studies
Biochem. J. 92, 179-187 (1964)
6. BAVAREL, G., M. BONNARD, E. D'ARMAGNAC DE CASTANET and
M. PELLET
Lactate and pyruvate metabolism in isolated
renal tubules of normal dogs
Kidney Int. 14, 567-573 (1978)
7. BAVAREL, G., M. BONNARD and M. PELLET
Lactate and pyruvate metabolism in isolated
humane kidney tubules
FEBS Letters 101, 282-286 (1979)
8. BERGERON, M. and F. MOREL
Amino acid transport in rat renal tubules
Am J. Physiol. 216, 1139-1149 (1969)
9. BERGMAYER, H.U. and E. BERNT
Alpha-Ketoglutarat
In: Methoden der enzymatischen Analyse
(ed. Bergmeyer, H.U.), 1241-46 (1974)
Verlag Chemie, Weinheim

10. BERGMAYER, H.U., E. BERNT, F. SCHMIDT und H. STORK
D - Glucose
In: Methoden der enzymatischen Analyse
(ed. Bergmeyer, H.U.), 1241-46 (1974)
Verlag Chemie, Weinheim
11. BERNT, E. und H.U. BERGMAYER
L - Glutamat
In: Methoden der enzymatischen Analyse
(ed. Bergmeyer, H.U.), 1749-53 (1974)
Verlag Chemie, Weinheim
12. BHATNAGAR, R.S. and R.S. RAPAKA
Synthetic polypeptide models of collagen:
synthesis and applications
In: Biochemistry of collagen
(eds. Ramachandran, G.N. and A.H. Reddi)
479-523 (1976) Plenum Press, New York and
London
13. BROSEMER, R.W. and P.S. VEERABHADRAPPA
Pathway of proline oxidation in insect
flight muscle
Biochim. Biophys. Acta 110, 102-112 (1965)
14. BRUNNER, G and W. NEUPERT
Localisation of proline oxidase and
 Δ^1 -pyrroline-5-carboxylic acid dehydro-
genase in rat liver
FEBS Letters 3, 283-286 (1969)
15. BUDDECKE, E.
Grundriß der Biochemie
(1974) Walter de Gruyter, Berlin - New York
16. BURCH, H.B., S. CHOI, W.Z. MCCARTHY, P.Y. WONG and
O.H. LOWRY
The location of glutamine synthetase
within the rat and rabbit nephron
Biochem. Biophys. Res. Commun. 82,
498-505 (1978)
17. CHAN, A.W.K., S.G. PARRY, H.B. BURCH, S. FAGLIOLI,
T.R. ALVEY and O.H. LOWRY
Distribution of two aminotransferases and
D-amino acid oxidase within the nephron
of young and adult rats
J. Histochem. Cytochem. 27, 751-755 (1979)
18. CHEN, R.F.
Removal of fatty acids from serum albumin
by charcoal treatment
J. Biol. Chem. 242, 173-191 (1967)

19. CHINARD, F.P.
Photometric estimation of proline and ornithine
J. Biol. Chem. 199,91 (1952)
20. CHURCHILL, P.C. and R.L. MALVIN
Relation of renal gluconeogenesis to ammonia production in the dog
Am. J. Physiol. 218, 241-245 (1970)
21. COHEN, J.J.
Substrate specific support for renal function and renal tissue composition
In: Proc. 8th Int. Congr. Nephrol. 821-826 (1981) University Studio, Thessaloniki, S.Karger - Basel
22. COHEN, J.J. and M. BARAC-NIETO
Renal physiology
In: Handbook of Physiology, Sect. 8 (eds. Orloff, J. and R.W. Berliner) 909-1002 (1973)
Am. Physiol. Soc., Washington, D.C.
23. CORNELL, N.W., P. LUND and H.A. KREBS
The effect of lysine on gluconeogenesis from lactate in rat hepatocytes
Biochem. J. 142, 327-337 (1974)
24. CURTHOYS, N.P. and R.A. SHAPIRO
Mechanism of glutamate inhibition of rat renal phosphate-dependent glutaminase
Abstract Reproduction Form from Sec. Int. Workshop on Ammoniogenesis (1981)
25. CZOK, R. und W. LAMPRECHT
Pyruvat, Phosphoenolpyruvat und D-Glycerat-2-phosphat
In: Methoden der enzymatischen Analyse (ed. Bergmeyer, H.U.) 1491-96, (1974)
Verlag Chemie, Weinheim
26. DA FONSECCA-WOLLHEIM, F., H.U. BERGMAYER und I. GUTMANN
Ammoniak
In: Methoden der enzymatischen Analyse (ed. Bergmeyer, H.U.) 1850-53 (1974)
Verlag Chemie, Weinheim
27. DAVIES, B.M.A. and J. YUDKIN
Studies in biochemical adaptation:
The origin of urinary ammonia as indicated by the effects of chronic acidosis and alkalosis on some renal enzymes in the rat
Biochem. J. 52, 407-412 (1952)

28. DIES, F.; J. HERRERA, M. MATOS, E. AVELAR and G. RAMOS
Substrate uptake by the dog kidney in vivo
Am. J. Physiol. 218, 405-410 (1970)
29. EFRON, M.L.
Familial hyperprolinemia
N.E.J.M. 272, 1243 (1965)
30. FRIEDRICHS, D.
On the stimulation of gluconeogenesis by
L-lysine in isolated rat kidney cortex
tubules
Biochim. Biophys. Acta 392, 255-270 (1975)
31. GOLDSTEIN, L.
Regulation of renal glutamine deamination
Med. Clin. North. Am., 667-680 (1975)
32. GOLDSTEIN, L.
2-Ketoglutarate regulation of glutamine
transport and deamidation by renal mito-
chondria
Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 1136-41
(1976)
33. GRETH, W.E., S.O. THIER and S. SEGAL
The transport and metabolism of L-proline
-¹⁴C in the rat in vivo
Metabolism, 27, 975-985 (1978)
34. GUDER, W.
Regulation der Glukoneogenese der Niere
Habilitationsschrift München (1973)
35. GUDER, W.G. and S. PÜRSCHEL
The intracellular compartmentation of
metabolites in isolated kidney cortex
tubules
Int. J. Biochem. 12, 63-67 (1980)
36. GUDER, W. and B.D. ROSS
Enzyme distribution along the nephron
Kid. Int. in press (1982)
37. GUDER, W. and O. WIELAND
The effect of 3', 5'-cyclic AMP on glu-
cose synthesis in isolated rat kidney
tubules
In: Regulation of gluconeogenesis
(eds. Söling, H.D. and B. Willms)
226-235 (1971) Thieme Verlag, Stuttgart

38. GUDER, W.G. and O.H. WIELAND
Metabolism of isolated kidney tubules
Additive effects of parathyroid hormone
and free-fatty acids on renal gluconeogenesis
Eur. J. Biochem. 31, 69-79 (1972)
39. GUDER, W.G. and O.H. WIELAND
Metabolism of isolated kidney tubules
regulation of pyruvate dehydrogenase by
metabolic substrates
Eur. J. Biochem. 42, 529-538 (1974)
40. GUDER, W., W. WIESNER, B. STUTKOWSKI and O. WIELAND
Metabolism of isolated kidney tubules
Oxygen consumption, gluconeogenesis and
the effect of cyclic nucleotides in tubules
from starved rats
Z. Physiol. Chem. 352, 1319-28 (1971)
41. GUDER, W.G. and G. WIRTHENSOHN
Metabolism of isolated kidney tubules
Interactions between lactate, glutamine
and oleate metabolism
Eur. J. Biochem. 99, 577-584 (1979)
42. GUDER, W.G. and G. WIRTHENSOHN
Renal turnover of substrates
In: Renal transport of organic substances
(eds. Greger, R., F. Lang and S. Silbernagl)
66-77 (1981) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
43. GUTMANN, I. und A.W. WAHLEFELD
L-(+)-Lactat
In: Methoden der enzymatischen Analyse
(ed. Bergmeyer, H.U.) 1510-14 (1974)
Verlag Chemie, Weinheim
44. HAWORTH, I.C., T.L. PERRY, J.P. BLASS, S. HANSON and
N. LIRQUHART
Lactic acidosis in three sibs due to defects
in both pyruvate dehydrogenase and
2-ketoglutarate dehydrogenase complexes
Pediatrics 58, 564-572 (1976)
45. HEMS, D.A.
Metabolism of glutamine and glutamic acid
by isolated perfused kidneys of normal
and acidotic rats
Biochem. J. 130, 671-680 (1972)

46. HENSGENS, H.E.S.J., L.A.M. HENSGENS, A.J. MEIJER,
J.A. GIMPEL and J.M. TAGER
Urogenesis and gluconeogenesis from proline:
The respiratory chain as site of metabolic
control
In: The use of isolated liver cells and
kidney tubules in metabolic studies
(eds. Tager, J.M., H.D. Söling and J.R.
Williamson) 331-338 (1976)
Amsterdam
47. HENSGENS, H.E.S.J., A.J. MEIJER, J.R. WILLIAMSON,
J.A. GIMPEL and J.M. TAGER
Proline metabolism in isolated rat liver
cells
Biochem. J. 170, 699-707 (1978)
48. HERZFELD, A., V.A. MEZL and W.E. KNOX
Enzymes metabolizing Δ^1 -pyrroline-5-car-
boxylate in rat tissues
Biochem. J. 166, 95-103 (1977)
49. HÖHMANN, B.
Einführung biochemischer Ultramikrometho-
den bei zellphysiologischen Fragestellungen
am Nephron
Habilitationsschrift Heidelberg (1973)
50. HOLTZAPPLE, P., M. GENEL, C. REA and S. SEGAL
Metabolism and uptake of L-proline by
human kidney cortex
Pediatr. Res. 7, 818-825 (1973)
51. IRIAS, J.J. and R.E. GREENBERG
Relationship of renal gluconeogenesis
to control of ammonia formation
Am. J. Physiol. 223, 750-755 (1972)
52. JOHNSON, A.B. and H.J. STRECKER
The interconversion of glutamic acid and
proline
J. Biol. Chem. 237, 1876-82 (1962)
53. JUNGERMANN, K. und H. MÖHLER
Biochemie
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
(1980)
54. KAWABATA, Y., N. KATUNUMA and Y. SANADA
Characteristics of proline oxidase in rat
tissues
J. Biochem. 88, 281-283 (1980)

55. KOWALOFF, E.M., J.M. PHANG, A.S. GRANGER and S.J. DOWNING
Regulation of proline oxidase activity by lactate
Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5368-71 (1977)
56. KREBS, H.A., G. BAVAREL and P. LUND
Effect of bicarbonate on glutamine metabolism
Int. J. Biochem. 12, 69-73 (1980)
57. KREBS, H.A., D.A.H. BENNETT, P. DE GASQUET, T. GAS-COGNE and T. YOSHIDA
Renal gluconeogenesis
Biochem. J. 86, 22-27 (1963)
58. KREBS, H.A. and K. HENSELEIT
Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper
Z. Physiol. Chem. 210, 33-36 (1932)
59. KREBS, H.A., R.N. SPEAKE and R. HEMS
Acceleration of renal gluconeogenesis by ketone bodies and fatty acids
Biochem. J. 94, 712-720 (1965)
60. KVAMME, E.
Regulation of pig kidney phosphate activated glutaminase
Abstract Reproduction Form from Sec. Int. Workshop on Ammoniogenesis (1981)
61. LANG, K. und H. Lang
Der Prolin-Oxydase-Komplexe
Biochem. Z. 329, 577-598 (1958)
62. LEMIEUX, G., G. BAVAREL, P. VINAY and P. WADOUX
Glutamine synthetase and glutamyltransferase in the kidney of man, dog and rat
Am. J. Physiol. 231, 1068-73 (1976)
63. LEMIEUX, G., P. VINAY and P. CARTIER
Renal hemodynamics and ammoniogenesis
J. Clin. Invest. 53, 884-894 (1974)
64. LUND, P.
L-Glutamin
In: Methoden der enzymatischen Analyse (ed. Bergmeyer, H.U.) 1767-69 (1974)
Verlag Chemie, Weinheim

65. MARLISS, E.B., T.T. AOKI, C.J. TOEWS, P. FELIG, J.J. CONNON, J. KYNER, W.E. HUCKABEE and G.F. CAHILL JR.
Amino acid metabolism in lactic acidosis
Am. J. Med. 52, 474-481 (1972)
66. MEISTER, H.
(120) Δ_1 -Piperideine-2-carboxylate and Δ_1 -pyrroline-2-carboxylate reductase
In: Methods of Enzymology V (eds. Colowick, S.P. and N.O. Kaplan) 878-882 (1962)
Academic Press, New York and London
67. METZLER, D.E.
Biochemistry
Academic Press, New York and London (1977)
68. MEYER, J.
Proline transport in rat liver mitochondria
Arch. Biochem. Biophys. 178, 387-395 (1977)
69. MÖLLERING, H., A.W. WAHLEFELD und W. MICHAL
Visualisierung NAD(P)-abhängiger Reaktionen
In: Methoden der enzymatischen Analyse (ed. Bergmeyer, H.U.) 145-153 (1974)
Verlag Chemie, Weinheim
70. OWEN, O.E., P. FELIG, A.P. MORGAN, J. WAHREN and G.F. CAHILL JR.
Liver and kidney metabolism during prolonged starvation
J. Clin. Invest. 48, 574-583 (1969)
71. OWEN, O.E. and R.R. ROBINSON
Amino acid extraction and ammonia metabolism by the human kidney during the prolonged administration of ammonium chloride
J. Clin. Invest. 42, 263-276 (1963)
72. PFALLER, W.
Structure function correlation on rat kidney
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1982)
73. PITTS, R.F.
Production and excretion of ammonia in relation to acid-base regulation
In: Handbook of Physiology (eds. Orloff, J. and R.W. Berliner) 455-496 (1973)
Washington, D.C.

76. ROGNSTAD, R. and J. KATZ
Gluconeogenesis in the kidney cortex
Effects of D-malate and amino-oxyacetate
Biochem. J. 116, 483-491 (1970)
77. ROXE, P.M., G.E. SCHREINER and H.G. PREUSS
Regulation of renal gluconeogenesis and
ammoniogenesis by physiologic fuels
Am. J. Physiol. 225, 908-911 (1973)
78. SCARPULLA, R.C. and R.L. SOFFER
Membrane-bound proline dehydrogenase from
E. coli
Solubilization, purification and characteri-
zation
J. Biol. Chem. 253, 5997-6001 (1978)
79. SCHOOLWERTH, A.C. and K.F. LaNOUE
The role of microcompartmentation in the
regulation of glutamate metabolism by rat
kidney mitochondria
J. Biol. Chem. 255, 3403-11 (1980)
80. SHALHOUB, R., W. WEBER, S. GLABMAN, M. CANESSA-FISCHER,
J. KLEIN, J. DE HAAS and R.F. PITTS
Extraction of amino acids from and their
addition to renal blood plasma
Am. J. Physiol. 204, 181-186 (1963)
81. SILBERNAGL, S.
Tubular reabsorption of L-glutamine stu-
died by free-flow micropuncture and micro-
perfusion of rat kidney
Int. J. Biochem. 12, 9-16 (1980)
82. SILBERNAGL, S.
Renal transport of amino acids and oli-
gopeptides
In: Renal Transport of Organic Substances
(eds. Greger, R., F. Lang and S. Silber-
nagl) 93-117 (1981) Springer-Verlag, Ber-
lin-Heidelberg-New York
83. SILBERNAGL, S., E.C. FOULKES and P. DEETJEN
Renal transport of amino acids
In: Reviews of Physiology, Biochemistry
and Pharmacology, Vol. 74
105-167 (1975) Springer-Verlag, Berlin-
Heidelberg-New York
84. SMITH, O.K. and C.N.H. LONG
Renal gluconeogenesis in eviscerated rats
Proc. Natl. Acad. Sci. 68, 1618-22 (1971)

85. STETTEN, M.R. and R. SCHOENHEIMER
The metabolism of L-proline studied with
the aid of deuterium and isotopic nitrogen
J. Biol. Chem. 153, 113-132 (1944)
86. STRECKER, H.J.
The interconversion of glutamic acid and
proline
J. Biol. Chem. 235, 3218-23 (1960)
87. STRECKER, H.J.
(174a) The preparation of animal proline
oxidase (rat liver), and its use for the
preparation of Δ_1 -pyrroline-5-carboxy-
late
In: Methods of Enzymology, Vol. 17
(eds. Tabor, H. and C.W. Tabor) 251-254
(1971) Academic Press, New York and London
88. TIZIANELLO, A., G. DE FERRARI, G. GARIBOTTO, G. GURRERI
and C. ROBANDO
Renal metabolism of amino acids and ammonia
in subjects with normal renal function and
patients with chronic renal insufficiency
J. Clin. Invest. 65, 1162-73 (1980)
89. TIZIANELLO, A., G. DE FERRARI, G. GARIBOTTO, C. RO-
BANDO, N. ACQUARONE and G.M. GHIGGERI
Renal ammoniogenesis in an early stage of
metabolic acidosis in man
J. Clin. Invest. 69, 240-248 (1982)
90. TROLL, W. and J. LINDSLEY
A photometric method for the determination
of proline
J. BIOL. CHEM. 215, 655-660 (1955)
91. VALLE, D.L., J.M. PHANG and S.I. GOODMAN
Type 2 hyperprolinemia
Absence of Δ_1 -pyrroline-5-carboxylic acid
dehydrogenase activity
Science 185, 1053-54 (1974)
92. VINAY, P., G. LEMIEUX, P. CARTIER, M. AHMAD and
G. BAVAREL
Effect of fatty acids on renal ammonioge-
nesis in vivo and vitro studies
Am. J. Physiol. 231, 880-887 (1976)
93. VINAY, P. G. LEMIEUX, A. GOUGOUX and C. LEMIEUX
Response of the rat and dog kidney to
 H^+ concentration in vitro - a compara-
tive study with slices and tubules
Int. J. Biochem. 12, 89-98 (1980)

94. VÖLKL, H. and S. SILBERNAGL
Molecular specificity of tubular reabsorption of L-proline
A microperfusion study in rat kidney
Pflügers Arch. 387, 253-259 (1980)
95. WATFORD, M., Y. HOD, M.F. UTLER and R.W. HANSON
The significance of the intracellular distribution of phosphoenolpyruvate carboxykinase
Abstract Reproduction Form from Sec. Int. Workshop on Ammoniagenesis (1981)
96. WEIDEMANN, M.J. and H.A. KREBS
The fuel of respiration of rat kidney cortex
Biochem. J. 112, 149-166 (1969)
97. WEISS, L.
Regulation der Fettsäurebiosynthese auf der Stufe der Pyruvatdehydrogenase
Habilitationsschrift München (1975)
98. WILLIAMSON, D.H.
L-Alanin
In: Methoden der enzymatischen Analyse (ed. Bergmeyer, H.U.) 1724-27 (1974)
Verlag Chemie, Weinheim
99. WIRTHENSOHN, G. and W.G. GUDER
Triacylglycerol metabolism in the isolated rat kidney cortex tubules
Biochem. J. 186, 317-324 (1980)
100. WOMACK, M. and W.C. ROSE
The role of proline, hydroxyproline and glutamic acid in growth
J. Biol. Chem. 171, 37-50 (1947)

Lebenslauf

Name: Thomas Schorn
Geburtsdatum: 26. 7. 54
Geburtsort: Karlsruhe
Eltern: Dr. med. Alfons Schorn und Ehefrau Irmgard
geb. Konrad
Schule: 1961 - 1965 Volksschule Baden-Baden
1965 - 1973 Humanistisches Gymnasium in
Baden-Baden mit Abschluß Abitur
Wehrdienst: Okt.73-Apr.74 Grundwehrdienst

Ausbildung seit Beginn des Medizinstudiums

SS74-SS77 Universität Freiburg
August 76 ärztliche Vorprüfung
August 77 1. Abschnitt d. ärztlichen Prüfung
WS77/78 Medizinische Hochschule Hannover
SS78-SS79 Universität Heidelberg
August 79 2. Abschnitt d. ärztlichen Prüfung
Dez.79-Nov.80 DAAD-Stipendium für das Praktische Jahr an
der Royal Postgraduate Medical School -
Hammersmith Hospital, Universität London
WS80/81- Ludwig-Maximilians-Universität München
Mai 81 3. Abschnitt d. ärztlichen Prüfung
Mai 81 Approbation
September 81 Visa Qualifying Examination
Jan.82- Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharma-
kologischen Institut der Universität München
(Leitung: Prof. Dr. W. Forth) im Rahmen
des Grundwehrdiensts

